Linzer biol. Beitr.	27/2	1161-1211	29.12.1995

Kreuzungsexperimente mit tetraploiden Sippen der *Achillea millefolium*-Gruppe (*Asteraceae*): Sesquiterpene und morphologische Merkmale hybridogener F_1-Populationen im Vergleich

S. VETTER

A b s t r a c t : Within the framework of this thesis tetraploid individuals of four different groups of the *Achillea millefolium*-complex (*A. ceretanica* SENNEN [tetraploid cytotype] (ined.), *A. collina* BECKER, *A. pratensis* SAUKEL & LÄNGER, *A. distans* WALDST. & KIT. subsp. *styriaca* SAUKEL & LÄNGER (ined.)) (*Asteraceae*) were cross-bred reciprocally. Sesquiterpene patterns and morphological characters of F_1-hybrids grown from seeds were investigated.

The determination of 5 sesquiterpene lactones, 2 longipinenone derivatives and 2 unknown substances based on CH_2Cl_2-extracts of dried inflorescences examined by qualitative thin layer chromatography led to the following results:

- Parent plants as well as F_1-individuals had clearly distinguishable sesquiterpene patterns, which could be grouped into different types.
- Heterocygoty of the parent plants was confirmed by the split-up within the F_1-populations into different sesquiterpene patterns.
- Due to TLC no recombination between proazulenogenic guaianolides and eudesmanolides could be observed.
- All offsprings of one crossing experiment with two plants both containing guaianolides are proazulenogenic.
- F_1-populations descended from individuals free of proazulenes showed 8-16 % individuals containing proazulenes.
- The property of proazulene synthesis seemed to be recessive.
- Longipinenones were detected with and without proazulenes.

Morphometric analysis of a small number of samples showed no differences between the two F_1-populations descended from one cross-breeding experiment.

Most of the F_1-crops were homogene, but some F_1-populations showed a large variability.

K e y w o r d s : *Asteraceae*, *Achillea millefolium* agg., sesquiterpenes, sesquiterpene lactones, inheritance, hybrids, TLC

Vorwort

Die vorliegende Arbeit ist Teil des interuniversitären Forschungsprojektes P09341-BIO „Vererbungsstudien an tetraploiden Taxa der *Achillea millefolium*-Gruppe (*Compositae*)" des FWF (Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung).

Mit diesem Projekt soll durch diallele Kreuzungsversuche mit Individuen ausgewählter Sippen des *Achillea millefolium*-Komplexes die Vererbung von Sesquiterpenlactonen sowie von Komponenten des ätherischen Öles untersucht werden. Darüber hinaus werden auch morphologisch-anatomische und cytologische Merkmale berücksichtigt, um weitere verwandtschaftliche Beziehungen innerhalb des Sippenkomplexes aufzeigen zu können.

Dabei fallen den einzelnen Projektpartnern folgende Aufgaben zu:

- dem *Institut für Botanik & Lebensmittelkunde der Veterinärmedizinischen Universität Wien*: die Kreuzungsversuche, Anbau der Pflanzen und die Untersuchung der Sesquiterpenlactone;
- dem *Institut für Pharmakognosie der Universität Wien*: die Isolierung und Identifizierung der Sesquiterpenlactone und Analysen des ätherischen Öles;
- dem *Institut für Botanik der Universität Wien*: die cytologischen Untersuchungen.

Derartige Hybridisierungsversuche sind von grundlegender Bedeutung für jede weitere Züchtungsarbeit (FRANZ 1986). Darüber hinaus erlauben sie auch, natürliche Hybridisierungsvorgänge experimentell nachzuvollziehen. Dies wiederum trägt zum besseren Verständnis der Evolution dieser Artengruppe bei. Somit bietet sich im Falle von *Achillea* eine „vielversprechende Zusammenarbeit ... geradezu an" (HEGNAUER 1989: 300f.).

Einleitung

Die Gattung *Achillea* umfaßt ca. 120 Arten, zumeist Kräuter und Halbsträucher, und ist hauptsächlich in der nördlichen Hemisphäre verbreitet. Das Zentrum der Mannigfaltigkeit liegt im östlichen Mittelmeergebiet und in Vorderasien. Von den insgesamt fünf Sektionen (*Millefolium*, *Ptarmica*, *Achillea*, *Babounya* und *Arthrolepis*) sind in Mitteleuropa nur Vertreter der beiden erstgenannten anzutreffen (WAGENITZ 1979).

Von den zahlreichen, bisher bekannten Naturstoffen sind für dieses Genus besonders Polyacetylene (BOHLMANN & JASTROW 1962, BOHLMANN & ZDERO 1973) und Alkamide (GREGER 1984, GREGER et al. 1981, 1982a, 1984), weiters Flavonoide (VALANT et al. 1978, VALANT-VETSCHERA 1984, 1985a, 1985b, VALANT-VETSCHERA & WOLLENWEBER 1988) und Sesquiterpenlactone (HEGNAUER 1989) von systematischer Bedeutung. Außerdem trägt auch noch die unterschiedliche Verbreitung von Cumarin-Sesquiterpenethern zu einer natürlicheren Gliederung der Gattung bei

(GREGER et al. 1982b, 1983a, 1983b). Darüber hinaus konnten für Sippen der *Achillea millefolium*-Gruppe charakteristische Monoterpenmuster gefunden werden (KASTNER et al. 1992b).

Aufbauend auf den Arbeiten von EHRENDORFER (1953, 1963, 1973), DĄBROWSKA (1977) und BISTE (1978) haben die jüngsten systematischen Bearbeitungen von SAUKEL & LÄNGER (1990, 1992b, 1992c) wiederum deutlich gemacht, daß es sich bei der Sektion *Millefolium*, insbesondere der *Achillea millefolium*-Gruppe, um einen sehr variablen Formenkreis handelt. Abgesehen von den diploiden Taxa (x = 9) *A.aspleniifolia* VENT., *A. setacea* WALDST. & KIT. und *A. roseo-alba* EHREND. existiert innerhalb der polyploiden Sippen (tetra-, hexa- und oktoploid) eine morphologisch schwer unterscheidbare Vielfalt (vgl. SAUKEL & LÄNGER 1990, 1992b, 1992c). Interspezifische Hybridisierungen (vgl. WAGENITZ 1979: 349) tragen ein übriges zu den systematischen Schwierigkeiten bei.

Die Blaufärbung des ätherischen Öles, wie sie seit langem schon bekannt war, ist sowohl bei der Schafgarbe als auch bei der Kamille auf Azulen zurückzuführen. Diese Verbindung kommt jedoch nicht genuin in der Pflanze vor, sondern entsteht im Zuge der Wasserdampfdestillation aus entsprechenden Vorstufen (STAHL 1954a, 1954b). Mit der Entwicklung und Verbesserung chromatographischer Methoden konnten diese *Pro*azulene isoliert und strukturell aufgeklärt werden. Dabei handelt es sich um Sesquiterpenlactone, die dem Guajanolidtyp zuzuordnen sind. Eine sehr gute wissenschaftsgeschichtliche Zusammenfassung findet sich bei KASTNER (1991).

Aufgrund unzulänglicher morphologischer Identifikation des Pflanzenmaterials wurden in weiterer Folge einzelne Taxa sowohl als azulenhaltig als auch als azulenfrei beschrieben (tabellarische Zusammenfassungen bei BISTE (1978: 592f.) und KASTNER (1991: 12ff.)). Mit heutigem Wissensstand ist das Merkmal „azulenhaltig" jedoch nur bei den diploiden Arten *A. aspleniifolia* und *A. roseo-alba* sowie der tetraploiden *A. collina* zu beobachten, fehlt aber generell bei hexa- und oktoploiden Arten (vgl. OSWIECIMSKA 1974).

In verschiedenen Arzneibüchern (ÖAB, DAC, Ph. Helv. VII, Pharm. Franc. X) jedoch wird als Stammpflanze für die Drogengewinnung nach wie vor *A. millefolium* L. genannt, für die im ÖAB (1990) (Herba Millefolii) 0.2% ätherisches Öl und 0.005% Azulen gefordert wird. Dieser Mindestgehalt an Azulen wird jedoch von dieser Art keinesfalls erfüllt (HÄNSEL et al. 1992).

In diesem Zusammenhang hat eine neuere Untersuchung von 20 Handelsmustern der Schafgarbe gezeigt, daß nur 10% davon den Anforderungen des ÖAB hinsichtlich des Azulengehaltes entsprachen (KASTNER et al. 1993a).

Trotz dieser Widersprüche und Gegensätze wurde (vgl. KASTNER 1991: 2) und wird die Schafgarbe als Arnzeipflanze verwendet (CHANDLER et al. 1982, SAUKEL & KUBELKA 1994). Therapeutische Anwendungen als Antiphlogistikum, Spasmolytikum und Cholagogum sind möglich (HÄNSEL et al. 1992, KASTNER et al. 1995), sowohl für

Azulen als auch für Proazulene wurden antiphlogistische Wirkungen nachgewiesen (siehe Kap. Biologische Aktivität, S. 1167).

Bereits 1952 postulierte GRAHLE aufgrund eingehender Untersuchungen von Pflanzen verschiedener Standorte, transplantierter Pflanzen sowie Analysen einer Blütenmischprobe einer durch Selbstung(!) (vgl. Kap. Kreuzungsversuche, S. 1176) erhaltenen Nachkommenschaft, „daß das Auftreten azulenhaltiger Formen genetisch bedingt ist." Noch im selben Jahr publizierte STAHL, daß aufgrund seiner Ergebnisse „das Auftreten oder Fehlen des Proazulens in der Schafgarbe erblich fixiert sein muß und daß die Bodenbeschaffenheit in diesem Zusammenhang nur eine untergeordnete Rolle spielen kann." In weiterer Folge konnte DEUFEL (1954) über den Ertrag an Blütenköpfchen den Azulengehalt an cholchiziniertem Pflanzenmaterial steigern. 1955 konnte STAHL Schafgarben-Stämme mit bis zu 50% Azulen im ätherischen Öl vorstellen und damit die Grundlage für weitere Züchtungsarbeiten legen. Er schreibt in diesem Zusammenhang - in einer Fußnote(!): „Als Vorteil gegenüber der Kamille fällt einmal der wesentlich höhere Proazulengehalt, zum anderen die Möglichkeit mehrjähriger Nutzung der anspruchslosen Schafgarbenkulturen bei zwei- bis dreimaliger Ernte pro Jahr und der wesentlich geringere Preis der Droge ins Gewicht."

Es folgte eine intensive und praxisorientierte Bearbeitung selektierter Schafgarben-Klone, wobei ein möglichst hoher Pro/Azulengehalt das primäre Zuchtziel darstellte (z.B. KOZLOWSKI & LUTOMSKI 1969, MATHE et al. 1963, TETENYI et al. 1962, 1963, TYIHAK et al. 1963). 1973 wurde die Sorte 'PROA" zugelassen, welche aus *A. collina* über Individualauslese mit Nachkommenschaftsprüfung selektiert wurde (PANK 1991). Dabei wurde ein halbquantitatives Verfahren für die Vorselektion proazulenreicher Typen entwickelt und eingesetzt (HEROLD & HANNING 1979). Aufgrund der bekannt hohen Variabilität der Schafgarbe sind aber weiterhin verschiedene Herkünfte untersucht und bearbeitet worden (BELANGER & DEXTRAZE 1992, CERNAJ et al. 1991, 1988a, 1988b, HOFMANN 1993, HOFMANN & FRITZ 1991, PETZOLDT 1991).

Nachdem CEKAN et al. (1956, 1957) Matricin, das einzige bislang aus *Matricaria chamomilla* L. (*chamomilla recutita* (L.) RAUSCHERT) bekannte Proazulen, isolieren und identifizieren konnten, wurde durch Nachkommenschaftsprüfungen (TETENYI 1961) und Kreuzungsversuche (FRANZ & WICKEL 1985) bewiesen, daß das Merkmal „pro/azulenhaltig" rezessiv vererbt wird. Vergleichbare Untersuchungen über die Vererbung der Proazulene bei *Achillea* fehlen trotz der intensiven Bearbeitung.

Aufbauend auf den beiden Dissertationen von EGLSEER (1990) und KASTNER (1991) wurde nun im Rahmen dieser Arbeit die Vererbung einiger Sesquiterpenlactone studiert. Darüber hinaus konnten zwei für die Gattung *Achillea* neue Longipinenonderivate (FOLLRICH 1995, FOLLRICH et al. 1995, GAVANELLI 1995) in die Untersuchungen miteinbezogen werden.

Dabei sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Lassen sich Sesquiterpen/lacton/e, welche in den Elternpflanzen sowie den F_1-Individuen nachgewiesen werden können, zu charakteristischen Inhaltsstoffmustern, bzw. -typen zusammenfassen?
- Stehen die Inhaltsstoffmuster, bzw. -typen der F_1-Nachkommenschaften in einem bestimmbaren Zahlenverhältnis zueinander?
- Kommt es zur Ausbildung neuer Stoffmuster?

Sesquiterpene

Sesquiterpene (C_{15}-Verbindungen) sind Metaboliten des Mevalonsäurestoffwechsels. Vom offenkettigen Farnesol, bzw. Farnesylpyrophosphat, lassen sich sowohl durch Cyclisierung als auch durch Substitution mit verschiedenen funktionellen Gruppen die unterschiedlichsten Strukturtypen und Derivate ableiten.

Sesquiterpene sind weit verbreitete Naturstoffe und wurden in unterschiedlichsten Taxa nachgewiesen (TEUSCHER & LINDEQUIST 1994).

Im Gegensatz zu vielen Publikationen über die Biogenese der Monoterpene (z.B. AKHILA & NIGAM 1983, CROTEAU et al. 1986, CROTEAU 1991, CROTEAU & GERSHENZON 1994, Mc CASKILL & CROTEAU 1994) ist die Biosynthese von Sesquiterpenen nur in einigen Fällen studiert worden (s. BANTHORPE & BRANCH 1985).

Mit ca. 4000 Derivaten (FISCHER 1993) stellen die Sesquiterpenlactone den größten Anteil innerhalb dieser Substanzklasse und sind aufgrund ihrer vielfältigen Wirkungen von besonderem Interesse.

Sesquiterpenlactone

Biosynthese

Durch Cyclisierung des C_{15}-Körpers des Farnesols (**A**) entsteht ein Germacranskelett (**B**), dessen Isopropylrest durch Carboxylierung aufoxidiert wird (**C**) (Abb. 1). Die beiden benachbarten C-Atome (*) sind gut exponierte Angriffspunkte für weitere Substitutionen (FISCHER 1993). Durch Hydroxylierung und anschließende Lactonbildung (**D**) entsteht ein Germacranolid-Grundkörper (**E**). Daraus können durch intramolekulare Ringschlüsse entweder zwischen C_5 und C_{10} Eudesmanolide (**F**) oder zwischen C_1 und C_5 Guajanolide (**G**) gebildet werden. Neben diesen drei Sesquiterpenlactontypen sind noch Pseudoguajanolide und weitere von den Germacranoliden abgeleitete Derivattypen zu nennen (RODRIGUEZ et al. 1976).

Zur Biogenese des Sesquiterpenlactons Quinghaosu (= Artemisinin) liegen genauere Ergebnisse vor (AKHILA et al. 1987, 1990).

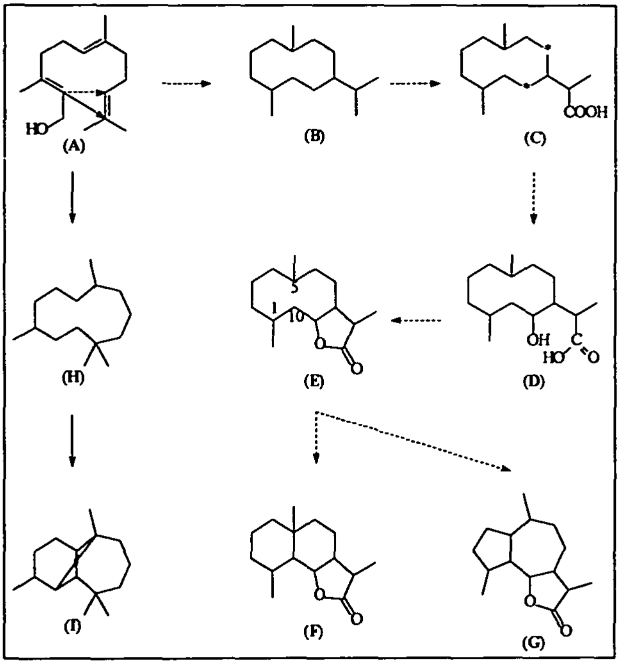


Abb. 1: Hypothetisches Biogeneseschema von Sesquiterpenlactonen und Longipinanen.

Vorkommen im Pflanzenreich

Diese Substanzgruppe konzentriert sich in ihrem Vorkommen hauptsächlich auf die Familie der *Asteraceae*. Ihre Derivate sind aber auch in anderen Familien der Angiospermen sowie bei den *Cupressaceaen*, Lebermoosen (*Hepaticae*) und Pilzen nachgewiesen worden (vgl. PICMAN 1986, RODRIGUEZ et al. 1976).

Sesquiterpenlactone gehören zusammen mit den Polyacetylenen (vgl. BOHLMANN et al. 1973) zur charakteristischen Stoffausstattung der *Asteraceae* und konnten bisher in allen Triben nachgewiesen werden. Aufgrund zahlreicher Ergebnisse eignet sich diese Stoffgruppe sehr gut für die Charakterisierung verschiedener Verwandtschaftsgruppen (HEGNAUER 1989). Besonders reich an Sesquiterpenlactonen sind die Triben *Anthemideae* (mit *Achillea*, *Artemisia*, *Chrysanthemum*, *Matricaria*, *Tanacetum*), *Cichorieae* (mit *Cichorium*, *Taraxacum*, *Lactuca*) und *Heliantheae* (mit *Ambrosia*, *Helianthus*, *Parthenium*, *Xanthium*).

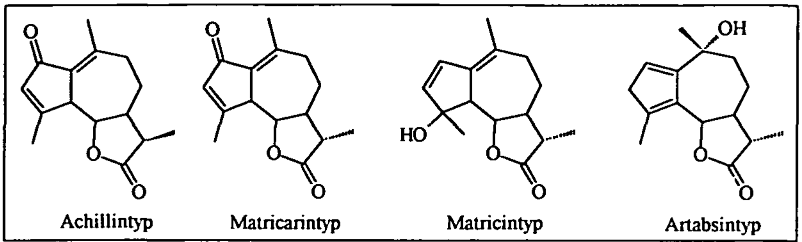


Abb. 2: Strukturtypen der Guajanolidderivate.

Von den verschiedenen Sesquiterpenlactontypen innerhalb der Tribus *Anthemideae* sind die azulenogenen Guajanolide besonders bekannt. Diese werden durch Wasserdampfdestillation in Azulen übergeführt (STAHL 1954a, 1954b), welches in weiterer Folge für die charakteristische blaue Farbe des ätherischen Öles verantwortlich ist.

Tab. 1: Literaturangaben über das Vorkommen verschiedener 6,7-Guajanolidtypen in *Achillea*.

Achillintyp	LINDE & RAGAB 1967, SMOLENSKI et al. 1967, TSANKOVA & OGNYANOV 1985, WHITE & WINTER 1963
Matricarintyp	BRUNO & HERZ 1988, EGLSEER 1990, EGLSEER et al. 1991, GLASL et al. 1994, STEFANOVIC et al. 1989
Matricintyp	KASTNER et al. 1991a, VERZAR-PETRI et al. 1980
Artabsintyp	KASTNER et al. 1991b, 1991c, 1991d, 1992a, OCHIR et al. 1991a, 1991b, VERZAR-PETRI et al. 1980

Innerhalb der 6,7-Guajanolide lassen sich bei *Achillea* der Achillin- und Matricarintyp unterscheiden, ferner sind Matricin- und Artabsinderivate beschrieben worden (Abb. 2, Tab. 1). Einzig in *Achillea aspleniifolia* sind 7,8-Guajanolide nachgewiesen worden (KASTNER et al. 1990). Eudesmanolide (GLASL et al. 1993, GLASL et al. 1995, ULUBELEN et al. 1988) und Germacranolide (KASYMOV & SIDYAKIN 1972, ULUBELEN et al. 1990) gehören auch zu den Inhaltsstoffen dieser Gattung. Über Peroxide dieses Genus berichtete BREUER (1992).

Biologische Aktivität

Über die biologische Aktivität der generell bitter schmeckenden Sesquiterpenlactone informieren die beiden Reviews von PICMAN (1986) und RODRIGUEZ et al. (1976) sowie TEUSCHER und LINDEQUIST (1994).

Als wohl prominentester Vertreter dieser Substanzklasse muß das als Anti-Malariamittel eingesetzte Derivat Quinghaosu aus *Artemisia annua* L. genannt werden (KLAYMAN 1985). Vielfach beschrieben wurde im Zusammenhang mit Sesquiterpenlactonen das Auftreten von Dermatitis (DAVIES & KERSEY 1986, HAUSEN & OESTMANN 1988, HAUSEN et al. 1991, MITCHELL et al. 1970, RÜCKER et al. 1991). Neben den vielfältigen pharmakologischen Wirkungen der Derivate dieser Stoffgruppe (antiödematös, antiphlogistisch, antitumoral, cytotoxisch, anthelmintisch, allergen, antileukämisch, mutagen, cytostatisch, antiplasmodial) (vgl. PICMAN 1986, s. auch KOLODZIEJ 1993) HALL et al. 1979, 1987 wurde auch die Guajanolide näher untersucht (AMMON & KNAUL 1992, KASTNER et al. 1993b, SAFAYHI et al. 1994, ZITTERL-EGLSEER et al. 1991, s. auch WILLUHN 1987). Synergistische Wirkungen dieser Substanzen mit Derivaten anderer Substanzklassen (Flavonoide, Komponenten des ätherischen Öles) sind bislang noch nicht geklärt.

Bezüglich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen liegt noch keine klare Meinung vor (vgl. PICMAN 1986: 275f.). Sowohl die Exomethylengruppe des α-Methylen-γ-lactonringes als auch die Doppelbindung des α,β-ungesättigten Cyclopentenonringes können nukleophile Reaktionen mit schwefelhaltigen Aminosäuren eingehen (KUPCHAN et al. 1970). Dieser Reaktionsmechanismus wird für das allergene Potential dieser Derivate verantwortlich gemacht. Darüber hinaus soll eine Hydroxylgruppe in der unmittelbaren Nachbarschaft des Lactonringes eine Steigerung der biologischen Aktivität bewirken (FISCHER 1993). Ferner müssen wohl auch „differences in physiology and biochemistry between various organisms affected by these compounds" in Betracht gezogen werden (PICMAN 1986).

Longipinane

Die Entstehung der sehr seltenen Struktur der Longipinane kann mit einer anderen als bei den Sesquiterpenlactonen dargestellten Cyclisierung des Farnesols, bzw. Farnesylpyrophosphats, erklärt werden (**H** in Abb. 1, S. 1166). Zwei weitere intramolekulare Ringschlüsse führten dann zu dem Grundgerüst (**I**) dieser Derivatengruppe.

Im Gegensatz zu den Sesquiterpenlactonen ist von den Longipinanen nur ein knappes Dutzend an Derivaten bekannt. Diese Substanzen sind in verschiedenen Gattungen (*Artemisia*, *Stevia*, *Tanacetum*, *Lavandula*, *Scapania*, *Marsupella*, *Polypteris*) nachgewiesen worden (CONNOLLY & HILL 1994). Erst in jüngster Zeit konnten zwei Derivate auch aus *Achillea* isoliert und strukturell aufgeklärt werden (FOLLRICH 1995, FOLLRICH et al. 1995, GAVANELLI 1995).

Derivatekatalog

Bei der qualitativen Auswertung der Dünnschichtplatten (s. Kap. Phytochemische Untersuchungen, S. 1177) wurden 9 Substanzen berücksichtigt, von denen 7 ihrer Struktur nach bekannt und als Sesquiterpene zu bezeichnen sind (Abb. 3).

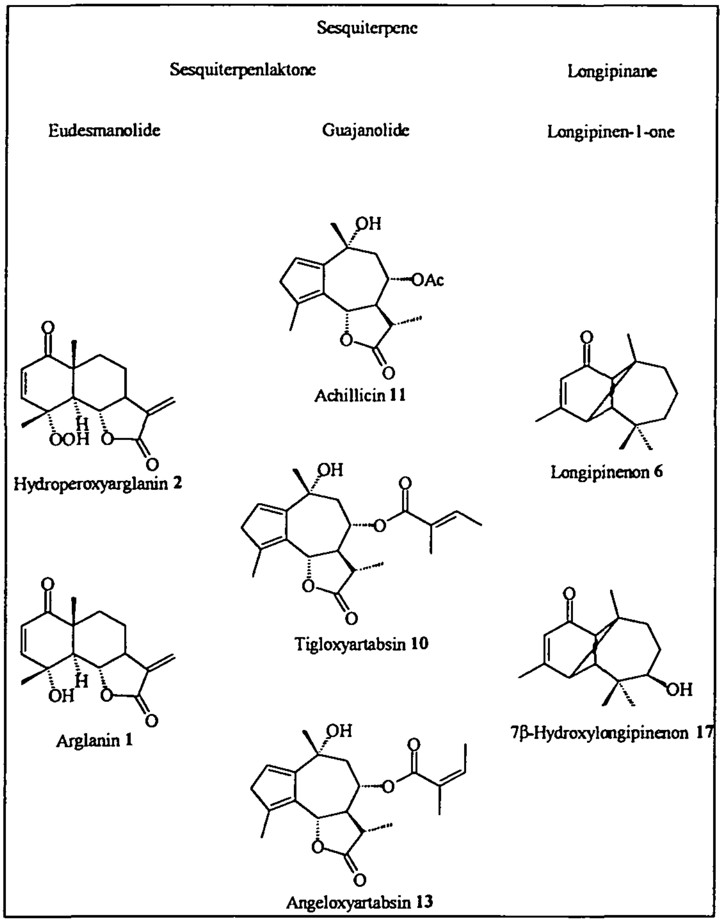


Abb. 3: Strukturformeln der untersuchten Sesquiterpene.

Zum einen handelt es sich dabei um die beiden Longipinanderivate Longipinen-1-on (**6**) und 7β-Hydroxylongipinen-1-on (**17**), zum anderen um Sesquiterpenlactone. Von diesen sind Arglanin (**1**) und sein Hydroperoxy-Derivat (**2**) Eudesmanolide, Achillicin (**11**) und seine beiden Derivate Angeloxy- (**13**) und Tigloxyartabsin (**10**) sind proazulenogene Guajanolide.

Die beiden Longipinenone konnten aus *Achillea distans* subsp. *styriaca* (FOLLRICH 1995, FOLLRICH et al. 1995, GAVANELLI 1995), die Eudesmanolide aus *A. pratensis*

(GLASL et al. 1993, GLASL et al. 1995) isoliert werden. Über die Verbreitung der hier berücksichtigten Guajanolide gibt Tab. 2 Auskunft. Weiters sind in den genannten Arten 3-Oxa-guajanolide nachgewiesen worden (KASTNER et al. 1991b, OCHIR et al. 1991a, SCHRÖDER et al. 1994).

Tab. 2: Literaturangaben über das Vorkommen der drei proazulenogenen Guajanoliden Achillicin, Angeloxyartabsin und Tigloxyartabsin in einigen *Achillea*-Arten.

	A. roseo-alba	*A. collina*	*A. millefolium* subsp. *collina*	*A. millefolium*
Achillicin (**11**)	KASTNER et al. 1991a	KASTNER et al. 1991d	VERZAR-PETRI et al. 1980	CUONG al. 1979
Angeloxyartabsin (**13**)	—"—	—"—	—"—	
Tigloxyartabsin (**10**)	—"—	—"—		

Material und Methoden

Elternpflanzen

Vorangegangene Kreuzungsexperimente mit diploiden *Achillea*-Arten (*A. aspleniifolia* VENT., *A. setacea* WALDST. & KIT.) (EGLSEER 1990, EHRENDORFER 1957) waren wiederholt auf Schwierigkeiten gestoßen, da nur in wenigen Fällen reziproke Nachkommenschaften erhalten werden konnten. Von polyploiden Sippen hingegen ist bekannt, daß sie sehr leicht miteinander hybridisieren (EHRENDORFER 1963, HIESEY & NOBS 1970).

Tab. 3: Elternpflanzen (Individualnummern, Artname, Herkunft) welche für die interspezifischen Kreuzungsexperimente verwendet wurden.

IdNr	Artname	Herkunft	legit
{14,17}	*A. pratensis* SAUKEL & LÄNGER	Österreich, Steiermark; NO-Ecke eines Steinbruches südl. von Kurzheim, westl. von Trofaiach (BMN 6701); loc. class.	S.V., 8.6.1992
{19, 21}	*A. distans* WALDST. & KIT. subsp. *styriaca* SAUKEL & LÄNGER (ined.)	Österreich, Steiermark; Jakob/Mixnitz, Eglauer-Klösch, Dürreggergraben zw. 1. & 2. Kehre (BMN 6703)	S.V., 8.6.1992
{27}	*A. collina* BECKER	Österreich, Niederösterreich; südl. v. Kalksburg, nördl. d. trigonometr. Punktes 345 (BMN 7806)	S.V., 30.6.1992
{47}	*A. ceretanica* SENNEN-4x (ined.)	Frankreich; Aveyron, Bozouls	F.E., 12.9.1991

Daher wurden als Elternpflanzen für die im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Hybridisierungsversuche tetraploide Individuen sowohl proazulenfreier als auch proazulenhaltiger Sippen ausgewählt (Tab. 3).

Die beiden proazulenfreien Individuen {14} und {17} (Abb. 4 bzw. Abb. 5) sind Vertreter der Species *A. pratensis* SAUKEL & LÄNGER (SAUKEL u. LÄNGER, 1992a). Diese Art wurde von EHRENDORFER (1959) als tetraploider Cytotyp von A. roseo-alba EHREND. klassifiziert. Die unter *A. distans* WALDST. & KIT. *subsp. styriaca* SAUKEL & LÄNGER vorgestellten Pflanzen {19, 21} (Abb. 8 bzw. Abb. 6f.), ebenfalls proazulenfrei, sind keine typischen Vertreter dieser als „DIS A" noch in Bearbeitung stehenden Gruppe (SAUKEL u. LÄNGER, 1992c). Dabei handelt es sich um eine der hexaploiden *A. distans* ähnliche Sippe, die jedoch tetraploid ist. Auffallend ist hier im Vergleich zu *A. pratensis* die hohe Anzahl an Fiederzähnchen und der geringe Abstand zwischen den Fiedern. Das proazulenhaltige Individuum {27} wurde *A. collina* BECKER zugeordnet, neben dem atypisch reich verzweigten Blütenstand fehlt die für *A. ollina* charakteristische Behaarung (Abb. 9). Bei der ebenfalls proazulenhaltigen Pflanze {47} (Abb. 10f.) handelt es sich um einen tetraploiden Cytotyp der diploiden *A. ceretanica* SENNEN s.str. (EHRENDORFER unveröffentl.). Hier fallen vor allem die fein zerteilten Blätter auf, die durch geringen Fiederabstand (FAB) und Fiederendzipfel (FEZL, FEZB, Index) gekennzeichnet sind.

Zur weiteren Charakterisierung der Elternpflanzen sind in Tab. 10 (S. 1184) die Inhaltsstoffmuster und in Tab. 13 (S. 1189 einige morphologische Merkmale aufgelistet.

Die Pflanzen wurden von Naturstandorten gesammelt und in den Versuchsgarten des Institutes für Botanik und Lebensmittelkunde der Veterinärmedizinischen Universität Wien transplantiert. Das Individuum {47} war zuvor bis 13.7.92 im Versuchsgarten des Botanischen Institutes der Universität Wien in Kultur (ACH-10222/X; Sammlung F. EHRENDORFER).

Von den Elternindividuen wurden Belege im Herbarium des Institutes für Botanik und Lebensmittelkunde der VMU Wien hinterlegt. Unter Mithilfe von Doz. SAUKEL (Institut für Pharmakognosie der Universität Wien) wurde das Pflanzenmaterial bestimmt (vgl. ADLER et al., 1994; SAUKEL u. LÄNGER, 1992a; 1992b; 1992c).



Abb. 4: Photo des Herbarbeleges von {14}, *Achillea pratensis* SAUKEL & LÄNGER.



Abb. 5: Photo des Herbarbeleges von {17}, *Achillea pratensis* SAUKEL & LÄNGER.

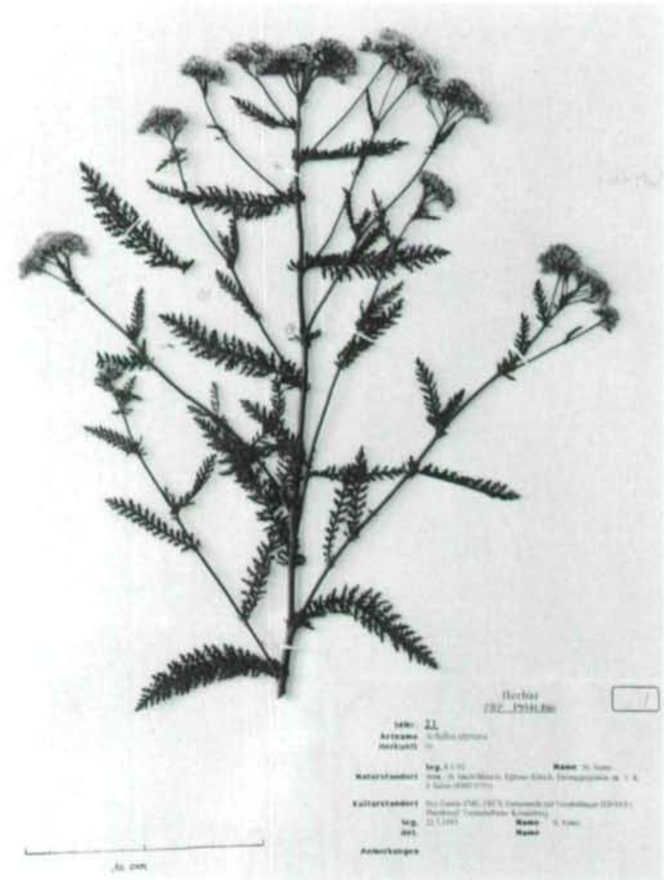


Abb. 6: Photo des Herbarbeleges von {21},
Achillea distans WALDST. & KIT. subsp. *styriaca* SAUKEL &
LÄNGER (Teil 1)



Abb. 7: Photo des Herbarbeleges von {21},
Achillea distans WALDST. & KIT. subsp. *styriaca* SAUKEL &
LÄNGER (Teil 2)



Abb. 8: Photo des Herbarbeleges von {19},
Achillea distans WALDST. & KIT. subsp. *styriaca* SAUKEL & LÄNGER.

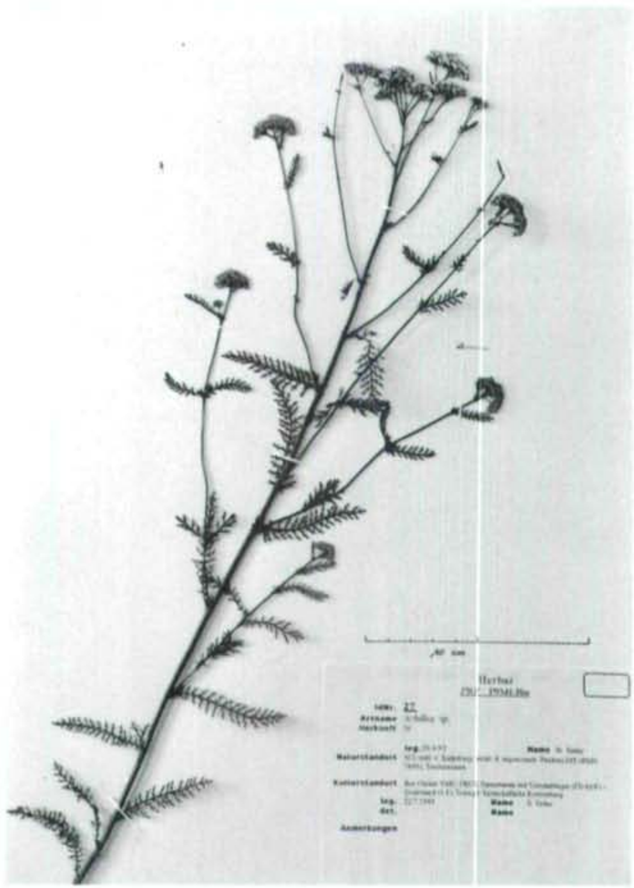


Abb. 9: Photo des Herbarbeleges von {27},
Achillea collina BECKER.

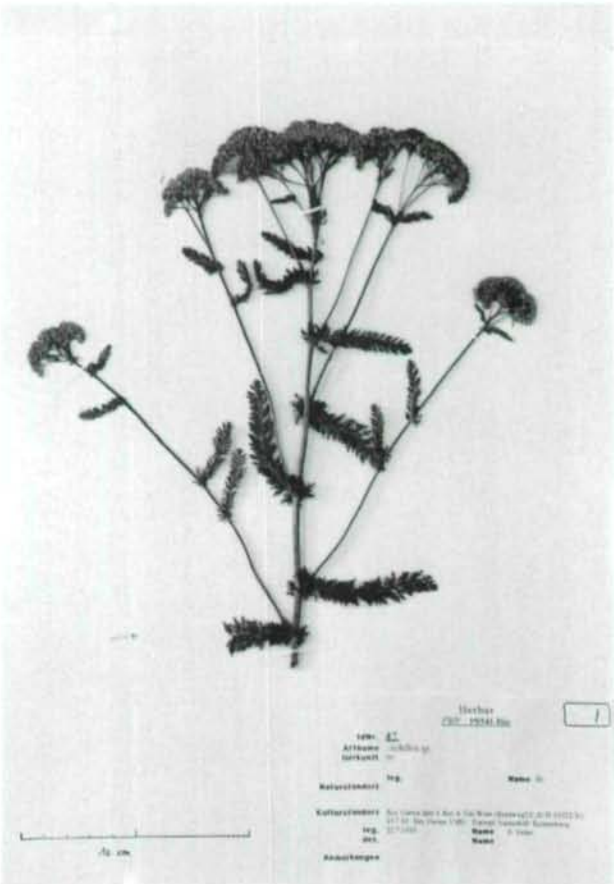


Abb. 10: Photo des Herbarbeleges von {47}, *Achillea ceretanica* SENNEN (4x) (Teil 1).



Abb. 11: Photokopie des Herbarbeleges von {47}, *Achillea ceretanica* SENNEN (4x) (Teil 2).

Kreuzungsversuche

Tab. 4: Kreuzungsschema, Bezeichnung der F_1-Nachkommenschaften und Angabe der Individualnummern der F_1-Hybriden.

Species	♀ ♂	Species	F_1	F_1-IdNr.
A. pratensis	14 x 19	*A. distans* subsp. *styriaca*	**1419**	475-581
A. pratensis	17 x 21	*A. distans* subsp. *styriaca*	**1721**	725-851
A. distans subsp. *styriaca*	19 x 14	*A. pratensis*	**1914**	582-683
A. distans subsp. *styriaca*	21 x 17	*A. pratensis*	**2117**	852-973
A. distans subsp. *styriaca*	19 x 47	*A. ceretanica*	**1947**	1007-1080
A. ceretanica	47 x 19	*A. distans* subsp. *styriaca*	**4719**	1081-1097
A. ceretanica	47 x 27	*A. collina*	**4727**	1098-1225

Für die Kreuzungen wurde primär darauf geachtet, sowohl Individuen mit ähnlicher als auch mit unterschiedlicher Stoffausstattung zu kreuzen (Tab. 4).

Ausgehend von der Annahme ausschließlicher Fremdbefruchtung (vgl. Kap. Kreuzungsversuche, S. 1180) wurden Blütenstände der Elternindividuen mit dem Sichtbarwerden jeweils ihrer ersten Zungenblüten mit einem Pergamentsäckchen eingetütet, um eine unkontrollierte Bestäubung zu verhindern. Dazu wurde ein Schaumstoffstreifen (ca. 5mm breit, 5cm lang) unterhalb des Blütenstandes mehrmals um die Achse gewickelt, das Pergamentsäckchen nach dem Einwickeln der beiden unteren Ecken an diesen Stellen mit je einer Büroklammer um den Schaumstoffstreifen herum fixiert und mit einer Wäscheklammer an einem Bambusstecken befestigt. Die diallele Kreuzung der Partner erfolgte dann im Stadium der Vollblüte durch vorsichtiges Aneinanderreiben der Blütenstände (vgl. EGLSEER 1990, s. a. JEZEK 1989). Diese kontrollierte Bestäubung wurde 1-4mal während der darauffolgenden Tage wiederholt.

Für Selbstungsversuche mit Elternpflanzen wurden

- ein Blütenstand im Pergamentsäckchen belassen;
- 2 Blütenstände einer Pflanze gegenseitig bestäubt;
- vegetativ vermehrte Pflanzen miteinander gekreuzt.

Die Pergamentsäckchen verblieben auf den Blütenständen. Die abgetrockneten Infloreszenzen wurden geerntet, das Saatgut gereinigt.

Die von verschiedenen Naturstandorten gesammelten Elternpflanzen wurden mit einer Nummer {IdNr} gekennzeichnet. In weiterer Folge bezeichnet z. B. „**1419**" eine F_1-Nachkommenschaft (POP) mit {14} als Mutter und {19} als Vater, „**1914**" gilt für die entsprechende reziproke Kreuzungsnachkommenschaft. Mit „**141914**" wurden beide Nachkommenschaften der Kreuzungen 14 x 19 und 19 x 14 zusammengefaßt.

Anbau der F_1-Nachkommen

Der Anbau des Saatgutes und die Anzucht der Kreuzungsnachkommenschaften erfolgte unter Glashausbedingungen (Tab. 5).

Tab. 5. Glashausparameter für die Anzucht der Jungpflanzen.

	TT (°C)	NT (°C)	Licht (h)
Aussaat	20	12	11
Pikieren	20	12	11
1. Umtopfen	15	12	9

Das Saatgut wurde am 13.11.1992 in Kisten angebaut. Als Substrat wurde ED63 verwendet. Die Keimlinge wurden am 9. und 10.12.1992 pikiert, ein Monat später in Multitopfplatten à 38 Stück, nach weiteren 4 Wochen in Multitopfplatten à 24 Stück gesetzt. In diesen wurden die Jungpflanzen Anfang April 1992 zum Abhärten ins Freie gestellt. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Vergabe der Individualnummern {IdNr.} an die F_1-Individuen (s. Tab. 4, S. 1176).

Das Umtopfen der Pflanzen in Plastiktöpfe 17x17x17 cm^3 und Aussetzen in diesen auf der Versuchsfläche in Korneuburg/Wien erfolgte in der letzten Aprilwoche 1992. Die Individuen wurden in aufsteigender Reihenfolge ihrer Individualnummern in die Erde gesetzt, wobei jeweils die reziproken Nachkommenschaften nebeneinander zu stehen kamen. Dabei betrug der Abstand von Topfmitte zu Topfmitte in der Reihe sowie zwischen den Reihen je 50 cm.[1]

Herbarbelege einiger F_1-Hybriden aus verschiedenen Nachkommenschaften wurden im Herbarium des Institutes hinterlegt.

Phytochemische Untersuchungen

Die Untersuchung des Sesquiterpenmusters anhand von CH_2Cl_2-Extrakten getrockneter Blütenköpfchen wurde mittels qualitativer Dünnschichtchromatographie durchgeführt.

Die im Stadium der Vollblüte geernteten Infloreszenzen wurden in einem Umlufttrockner bei einer Temperatur von T = 37-40°C getrocknet.

100 ± 10 mg Blütenköpfchen wurden in einer Eprouvette mit 1ml CH_2Cl_2 p.A. versetzt und 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Mit einer Pasteurpipette, deren Spitze mit einem Wattebauschen umwickelt war, wurde der Extrakt in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß abpipettiert (KASTNER 1991). Über Nacht verdampfte das Lösungsmittel. In 0.1 ml CH_2Cl_2 p. A. wurde der Rückstand aufgenommen, die Extrakte im Tiefkühlfach (T = -15°C) gelagert.

---

[1] Bei den Versuchen des Jahres 1995 erwiesen sich jeweils 70 cm als günstigerer Abstand.

Tab. 6: Geräteparameter für die Dünnschichtchromatographie.

Gerätetyp	Linomat IV (Fa. CAMAG)
Probenvolumen	3 µl
Breite der Startbanden	1 mm
Abstand zwischen den Startbanden	4 mm
Abstand vom unteren Plattenrand	10 mm
Abstand vom linken Plattenrand	15 mm
Applikationsgeschwindigkeit	5 sec/µl
Plattengröße	10x10 cm²
Trägermaterial	DC-Fertigplatten Kieselgel 60, F254 (Fa. Merck)
Schichtdicke	0.25 mm

Nach dem Auftragen der Proben (Tab. 6) wurden 5 ml des Laufmittelgemisches, bestehend aus EtOAc/Et_2O/n-Hexan (0.5 ml + 3.2 ml + 1.3 ml; siehe Dünnschichtchromatographische Analysen, S. 1181) in einen Trog einer Camag-Doppeltrogkammer gefüllt und die Platte ohne Kammersättigung mit einer Laufstrecke von 8 cm (in ca. 15 min) entwickelt.

Tab. 7: Detektion und Auswertung der untersuchten Substanzen (sortiert nach dem hRf-Wert).

Substanz	UV	EP-Reagens	AS-Reagens	hRf-Wert	hR_x-Wert*
Longipinenon (6)	+	—	**orange**	85	104
unbekannt S5	—	—	**violett**	82	100
Angeloxyartabsin (13)	+	**blau**	braun	69	84
Tigloxyartabsin (10)	+	**blau**	braun	64	79
Achillicin (11)	+	**blau**	braun	49	60
unbekannt S4	—	—	violett	48	59
Hydroperoxyarglanin (2)	—	**gelb**	—	38	46
Hydroxylongipinenon (17)	+	—	**orange**	33	41
Arglanin (1)	—	**gelb**	—	31	38
*Matricin***	+	***blau***	*braun*	*30*	

* hR_x-Wert = $(hRf_{Sx}/hRf_{S5})*100$

**Als Referenz eignet sich auch ein CH_2Cl_2-Blütenköpfchenextrakt proazulenhaltiger Kamille.

Die Detektion von 9 Substanzen (vgl. Abb. 3, S. 1169) erfolgte unter der UV-Lampe (λ = 256 nm) und mit zwei modifizierten Reagentien (s. Tab. 9, S. 1183). Als positiver Nachweis galten neben dem hRf-Wert die **fett** geschriebenen Parameter in Tab. 7. Die mit dem EP-Reagens blau gefärbten Substanzen bezeichnet man als Proazulene. Mit Hilfe eines Index, bezogen auf die in allen untersuchten Individuen nachgewiesene Substanz S5, ist es möglich, Unsicherheiten bei der Zuordnung der einzelnen Substanzflecken abzuklären (vgl. SCHÜTZ 1992).

Der positive Nachweis von Hydroxylongipinenon (17) ist bei proazulenhaltigen Individuen kritisch zu bewerten, da andere Proazulene mit dem gleichen hRf-Wert die orange Färbung dieser Substanz überdecken (können).

Jede der Substanzen wurde mit „0“ für negativen und „1“ für positiven qualitativen Nachweis bewertet.

Morphometrische Analysen

Diese Untersuchungen wurden an Herbarmaterial bzw. getrockneter Blütendroge durchgeführt. In Anlehnung an die dafür vorgestellten Meßmethoden (SAUKEL & LÄNGER 1992b) wurden folgende Merkmale erfaßt:

Abkürzung	Merkmal	Meßobjekt	Einheit	(N)
BLBO[1]	Blattbreite	Dauerpräparat	mm	1
BLLO[1]	Blattlänge	Herbar	mm	1
BL_AREA[1]	Blattfläche	=BLLO*BLBO	mm²	1
BSTL	Blütenstandslänge	Herbar	mm	1
FAB[1]	Fiederabstand	= BLLO/FZ	mm	1
FAREASM[1]	Fiederfläche	=FLSM*FBSM	mm²	1-2
FBSM[1]	Fiederbreite in der Spreitenmitte	Videophoto[2]	mm	1-2
FEZB1	Fiederendzipfelbreite	Videophoto[2]	µm	1-2
FEZL[1]	Fiederendzipfellänge	Videophoto[2]	µm	1-2
FLSM[1]	Fiederlänge in der Spreitenmitte	Videophoto[2]	mm	1-2
FRB[1]	Fiederrhachisbreite	Videophoto[2]	µm	1-2
FZ[1]	Fiederzahl (ohne Berücksichtigung des Öhrchens)			1
FZZMAX[1]	maximale Zähnchenzahl einer Fiederhälfte + terminales Zähnchen	Dauerpräparat		1-2
FZZMIN[1]	minimale Zähnchenzahl einer Fiederhälfte + terminales Zähnchen	Dauerpräparat		1-2
INL	durchschnittliche Internodienlänge	=PFL/KZ	mm	1
I_BL	Index	=BLLO/BLBO		
I_FEZ	Index	=FEZL/FEZB		
I_F_SM	Index	=FLSM/FBSM		
I_ZB1	Index	=ZBCRL/ZBZL		
I_ZB2	Index	=ZBZL/ZBZB		
KZ[3]	Knotenzahl	Herbar		1
PDMS	Pollendurchmesser mit Stacheln	mikroskopisches Präparat	µm	20
PDOS	Pollendurchmesser ohne Stacheln	mikroskopisches Präparat	µm	20
PFL	Pflanzenlänge	Herbar	mm	1
SUMFZZ	Zähnchenzahl einer Fieder	=FZZMAX+FZZMIN		1-2
ZBCRL	Corollröhrenlänge der Zungenblüte	Videophoto[2]	mm	1-4
ZBZAREA	Fläche der Zunge der Zungenblüte	=ZBZL*ZBZB	mm²	1-4
ZBZB	größte Breite der Zunge der Zungenblüte	Videophoto[2]	mm	1-4
ZBZL	größte Länge der Zunge der Zungenblüte	Videophoto[2]	mm	1-4

[1]diese Merkmale wurden an dem Blatt erhoben, das an der Grenze vom mittleren zum obersten Drittel des Hauptsprosses inseriert ist

[2]des Dauerpräparates

[3]gemessen von der Sproßbasis bis zum Beginn des terminalen Köpfchenstandes

Alle mikroskopischen (Dauer)Präparate wurden zuerst in einer Chloralhydratlösung (60%) aufgekocht. Die Dauerpräparate wurden in Glycerin-Gelatine eingebettet (DEUTSCHMANN et al. 1984), mit einer Videoeinrichtung gefilmt und über einen Videoprinter ausgedruckt. Im Vergleich mit einer mitphotographierten Meßskala wurden die Bilder morphometrisch ausgewertet.

Statistische Auswertung

Die Auswertungen der erhobenen Daten wurde mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS for Windows (v. 6.0) durchgeführt. Häufigkeitsverteilungen innerhalb der F_1-Populationen wurden mit dem χ^2-Test auf dem 5%-Niveau geprüft.

Bei den Analysen der morphometrischen Daten (vgl. WITTENBERG & CRAMER 1992) wurden zuerst alle Meßwerte und die aus diesen gebildeten Maße (i.e. Indices, Summen) auf ihre Normalverteilung überprüft.[2] In den anschließenden Analysen mittels einfacher Varianzanalyse (oneway, Bonferroni-Holm-Test) wurde auch die Varianzhomogenität geprüft (Levene's Test). Da diese jedoch nicht für alle Merkmale gegeben war, wurde zur Prüfung signifikanter Unterschiede zwischen den F_1-Nachkommenschaften auch der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test eingesetzt.

Ergebnisse

Kreuzungsversuche

Alle Selbstungsversuche mit Elternpflanzen verliefen negativ. Das bestätigt die sehr hohe homogenetische Inkompatibilität der Pflanzen, wie sie für die Gattung *Achillea* aus vorangegangenen Arbeiten bereits bekannt ist (EGLSEER 1990, EHRENDORFER 1957).

Tab. 8: Ergebnisse der Kreuzungsversuche: Anzahl der Samen, TKG und Größe der F_1-Nachkommenschaften (POP).

Kreuzung	Achänen (Anzahl)	TKG (mg)	Pikieren (Anzahl)	Pop	Feld-Anbau (Anzahl)
14x19	114	167	107	**1419**	107
19x14	113	142	102	**1914**	102
17x21	120	167	128	**1721**	127
21x17	181	116	122	**2117**	122
19x47	93	129	75	**1947**	74
47x19	17	118	17	**4719**	17
47x27	139	129	128	**4727**	128

Die Kreuzungsversuche zwischen den Arten hingegen erbrachten mit Ausnahme von **2747** positive Ergebnisse (Tab. 8). Die Saatgutausbeute war in allen Fällen ausreichend, nur bei 47 x 19 lag sie weit unter der der anderen Kreuzungen. Das (errechnete) Tausendkorngewicht (TKG) der beiden Kreuzungen mit *A. pratensis* als Mutter (14 x 19, 17 x 21) zeigte höhere TKG-Werte als die beiden reziproken Kreuzungen.

2 Dazu wurden stem & leaf-plots sowie Wahrscheinlichkeits- und trendbereinigte Wahrscheinlichkeitsplots „intuitiv" beurteilt. Weitere statistische Tests (Vergleich von arithmetischem Mittel mit dem Median und dem Modus; Signifikanztests von Steilheit und Schiefe der Verteilungskurven; Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest an eine Normalverteilung) bestätigten für alle Variablen eine (± gleichmäßige) Normalverteilung.

Zwischen 19 x 47 und 47 x 19 waren derartige Unterschiede nicht zu beobachten, wobei hier zu bemerken ist, daß bei 47 x 19 nur 17 Samen geerntet wurden. Das TKG von 47 x 27 zeigte kaum Unterschiede zu dem der beiden letztgenannten Kreuzungen.

Anbau der F_1 Hybriden

Wie aus Tab. 8 ersichtlich, sind bei der Anzucht der Jungpflanzen unter Glashausbedingungen vernachlässigbare Verluste aufgetreten.
Durch das Einsetzen in Töpfen wurde die zu erwartende, sehr starke Ausläuferbildung auch im 2. Jahr des Bestandes (i.e. 1994) noch vollständig unterdrückt. Dabei mußte jedoch die leichtere Handhabbarkeit der Individuen für weitere Kreuzungsversuche aufgegeben werden, da die Pflanzen tief in den Boden hinein wurzelten und somit einer Umpflanzung zumeist eine sehr lange Erholungsphase folgte. Auf der anderen Seite konnte die Unkrautbekämpfung ohne größeren Zeitaufwand durchgeführt werden.

Phytochemische Untersuchungen

Dünnschichtchromatographische Analysen

Zu Vergleichszwecken sollten die Blütenköpfchenextrakte der beiden Elternpflanzen zusammen mit jeweils einigen der entsprechenden F_1-Nachkommen auf einer DC-Platte analysiert werden. Dazu war es notwendig, mit einem einzigen Laufmittelgemisch zur Trennung aller Hauptkomponenten zu arbeiten, welches mit Hilfe des PRISMA-Modells (NYIREDY et al. 1985) entwickelt wurde.
Im ersten Durchgang wurden 10 Lösungsmittel aus den 8 Lösungsmittelgruppen getestet und durch Verdünnen mit Hexan die Rf-Werte zwischen $0.2 < Rf < 0.8$ eingestellt (Lösungsmittelstärke $S_T = 2.7$). Da keines für sich allein positive Ergebnisse erbrachte, wurden EtOAc, $CHCl_3$ und Et_2O für das weitere Vorgehen ausgewählt. In verschiedenen Selektivitätspunkten (P_S = 333, 811, 181, 118) bei der oben gewählten Lösungsmittelstärke von $S_T = 2.7$ zeigten sich bei $P_S = 118$ gute Trennergebnisse. Die weitere Optimierung ergab im Selektivitätspunkt $P_S = 208$ die beste Trennung.
Die Identifikation und Zuordnung der Verbindungen erfolgte mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie, wobei das zweite Laufmittelgemisch (LM2) routinemäßig bei den Untersuchungen am Institut für Pharmakognosie verwendet wird (vgl. S. 1162) (KASTNER et al. 1991c). Dabei ergab sich für die Proazulene keine Verbesserung (Abb. 12). Für Arglanin (**1**) und Hydroperoxyarglanin (**2**) bzw. die Substanzen **S4** und **S5** hingegen konnten bessere Trennungen erzielt werden (Abb. 13).[3]

---

[3] In den beiden Abb. 12 und Abb. 13 kennzeichnen hervorgehobene Substanzflecken (UV-Löschung, gleiche Muster stellen gleiche Färbungen dar (s. Tab. 7, S 1178). LM1: EtOAc/Et_2O/n-Hexan (0.5 ml + 3.2 ml + 1.3 ml); LM2: CH_2Cl_2/CH_3COCH_3 (4.5 ml + 0.5 ml).

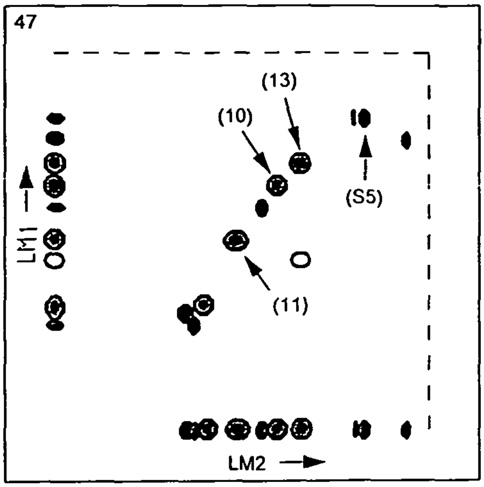


Abb. 12: Vergleich der Analysenergebnisse mittels zweidimensionaler DC mit den beiden Laufmittelgemischen LM1 und LM2 anhand des Blütenköpfchenextraktes der proazulenhaltigen Elternpflanze *A. ceretanica* (Typ B1 {47}).

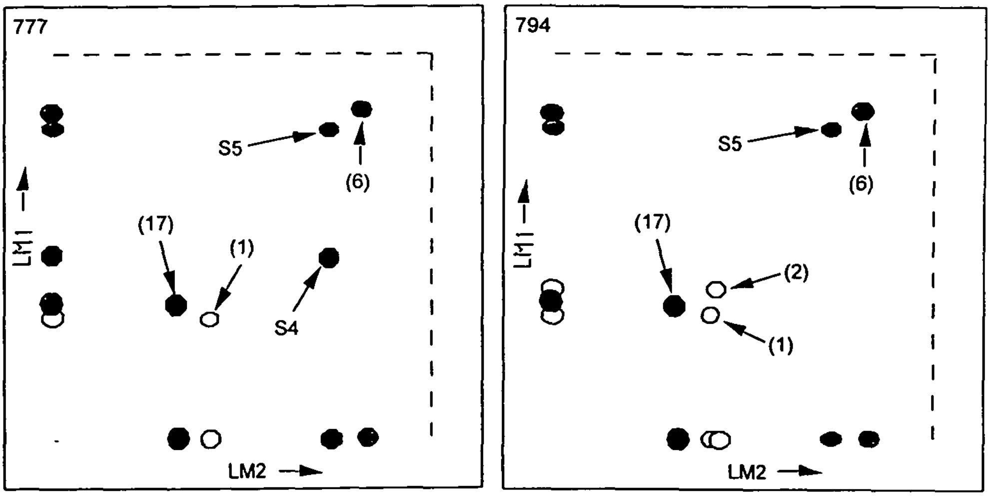


Abb. 13: Vergleich der Analysenergebnisse mittels zweidimensionaler DC mit den beiden Laufmittelgemischen LM1 und LM2 anhand der Blütenköpfchenextrakte proazulenfreier Individuen der F_1-Population **1721** (Typ A1 {777}, Typ A2 {794}).

Verwendet man das von STAHL (1967) angegebene Reagens (für den Nachweis von Proazulenen) zum *Besprühen* der Platten, so lassen sich die beiden Eudesmanolide Arglanin (1) und Hydroperoxyarglanin (2) als gelb gefärbte Zonen nachweisen. Verwendet man es in derselben Konzentration auch zum *Tauchen* der Dünnschichtplatten, sind die beiden Substanzen vom stark gelb gefärbten Untergrund nicht mehr zu unterscheiden. Daher wurden beide Nachweisreagentien mit den entsprechenden Lösungsmitteln unter langsamem Rühren verdünnt (Tab. 9), womit ein gezielter Nachweis dieser Verbindungen möglich war.

Tab. 9: Nachweisreagentien für die dünnschichtchromatographischen Analysen.

EP-Reagens		AS-Reagens	
5ml	A. dest.	51g	EtOH p.A.
5g	85% Phosphorsäure	6g	konz. Schwefelsäure
50g	Eisessig	3g	Anisaldehyd
250mg	p-Dimethylaminobenzaldehyd		
verdünnt mit			
300ml	A. dest.	240g	EtOH p.A.

Inhaltsstoffmuster der Elternpflanzen

Die als Elter verwendeten Pflanzen aus den beiden Sippen *Achillea pratensis* {14, 17} und *A. distans* subsp. *styriaca* {19, 21} waren proazulenfrei. Während Arglanin (1) zusammen mit einer noch nicht aufgeklärten Substanz **S4** und Longipinenon (6) (FOLLRICH 1995, FOLLRICH et al. 1995) für die zwei *A. distans* subsp. *styriaca*-Individuen charakteristisch waren (Typ A1), kennzeichnete der positive Nachweis von Arglanin (1) und Hydroperoxyarglanin (2) die beiden *A. pratensis*-Pflanzen (Typ A2) (GLASL et al. 1993, GLASL et al. 1995). Drei azulenogene Guajanolide, Achillicin (10) und dessen Angeloxy- (13) und Tigloxyderivat (10), konnten bei dem Elter {47} (*A. ceretanica*) nachgewiesen werden (Typ B1). Für Tigloxyartabsin (10) konnte bei {27} (*A. collina*) kein positiver Nachweis durchgeführt werden (Typ B2) (vgl. CUONG et al. 1979, KASTNER et al. 1991c, KASTNER et al. 1991d, VERZAR-PETRI et al. 1980). In allen Elternpflanzen wurde die ebenfalls noch nicht aufgeklärte Verbindung **S5** nachgewiesen (Tab. 10).

Tab. 10: Inhaltsstofftypen und deren Stoffmuster der Elternpflanzen.

	Species	*A. distans* subsp. *styriaca*	*A. pratensis*	*A. ceretanica*	*A. collina*
Substanz	{IdNr}	{19, 21}	{14, 17}	{47}	{27}
Achillicin (**11**)				•	•
Tigloxyartabsin (**10**)				•	
Angeloxyartabsin (**13**)				•	•
Hydroxylongipinenon (**17**)					
Longipinenon (**6**)		•			
Hydroperoxyarglanin (**2**)			•		
Arglanin (**1**)		•	•		
S4, unbekannt		•			
S5, unbekannt		•	•	•	•
Typen		A1	A2	B1	B2
		proazulenfrei		proazulenhaltig	

Inhaltsstofftypen und deren Stoffmuster in den F_1-Nachkommenschaften

Bei den F_1-Hybriden konnten sowohl die Stofftypen und -muster der Elternpflanzen als auch neue beobachtet werden (Tab. 11, S. 1185). Dabei war wiederum die Komponente **S5** in allen Individuen nachweisbar. Die Unterteilung in die beiden Gruppen „proazulenfrei" und „proazulenhaltig" blieb erhalten, d.h. bei keinem Individuum konnten Eudesmanolide und Guajanolide zusammen beobachtet werden.

Bei der proazulenfreien Gruppe konnten wie bei den Elternpflanzen die beiden Typen A1 und A2 unterschieden werden, die sich durch die stark negative Korrelation zwischen den Substanzen **S4** und Hydroperoxyarglanin (**2**) ergab. Dabei wurden Individuen, bei denen nur **S4**, bzw. (**2**) nachgewiesen werden konnte, dem erst-, bzw. zweitgenannten Typ zugeordnet. Ebenfalls zu dieser Gruppe wurden auch diejenigen Individuen gezählt, bei denen nur die Verbindung **S5** nachgewiesen werden konnte (Typ A3). In einem einzigen Fall wurden bei dem Individuum {826} aus der F_1-Nachkommenschaft **1721** neben den beiden Longipinenonen (**6**) und (**17**) die Substanzen (**1**), (**2**) und **S4** detektiert (Typ A4).

Innerhalb der proazulenhaltigen F_1-Pflanzen konnten neben den Inhaltsstoffmustern der Elternpflanzen mehrere neue beobachtet werden. Da sich dabei keine so klare Unterscheidungsmöglichkeit wie bei den proazulenfreien Individuen ergab, wurden die drei Guajanolide Achillicin (**11**) und dessen beiden Derivate (**10**) und (**13**) zum Typ B1, nur zwei dieser drei zum Typ B2, nur jeweils eines zum Typ B3 und unbekannte Verbindung/en zum Typ B4 zusammengefaßt.

Tab. 11: Inhaltsstofftypen und deren Stoffmuster innerhalb der F1-Populationen.

Substanz*														
(11)						•	•		•			•	
(10)						•	•	•			•		
(13)						•		•	•	•			
(17)	v	v	v	v	v	•	v	v		v	v			
(6)	v	v	v	v	v	•	v	v	v			v	v	
(2)			•	•		•								
(1)	•		•			•								
S4	•	•				•								
S5	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Typen	A1		A2		A3	A4	B1	B2			B3			B4
	proazulenfrei						proazulenhaltig							

*s. vorhergehende Tabelle

Longipinenon (6) (FOLLRICH 1995) und sein Hydroxyderivat (17) (GAVANELLI 1995) ließen sich sowohl bei proazulenfreien als auch bei proazulenhaltigen Individuen nachweisen (vgl. dazu unter Kap. Phytochemische Untersuchungen, S. 1181) und sind daher (...und sind daher) in der Tab. 11 mit „v" (variabel) gekennzeichnet. Aufgrund ihres von den Sesquiterpenlactonen abweichenden Grundgerüstes ließen sie sich in einer eigenen Gruppe mit den folgenden drei Inhaltsstofftypen zusammenfassen:

- Typ L1 mit Longipinenon (6)
- Typ L2 mit Hydroxylongipinenon (17)
- Typ L3 mit Longipinenon und Hydroxylongipinenon (6, 17).

Dabei zeigte sich, daß die Typen L2 und L3 neue Kombinationen darstellen, welche in keiner der Elternpflanzen beobachtet werden konnten (s. Tab. 10, S. 1184).

In Summe konnten in allen untersuchten F_1-Nachkommenschaften 38 verschiedene Inhaltsstoffmuster bestimmt werden.

Verteilung der Inhaltsstofftypen in den F_1-Nachkommenschaften

In allen F_1-Populationen konnten proazulenhaltige Individuen beobachtet werden (Abb. 14). Höchst bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß in den 4 Nachkommenschaften proazulenfreier Elternpflanzen **1419, 1914, 1721** und **2117** 8-16% proazulenhaltige Individuen auftraten. Es wurde jedoch bei der Auswertung der Dünnschichtchromatogramme keine semiquantitativen Unterschiede berücksichtigt, obwohl sich schon mit dieser Methode bei den Guajanoliden deutliche Konzentrationsunterschiede zwischen den proazulenhaltigen Nachkommen proazulenfreier

und proazulenhaltiger Elternpflanzen feststellen ließen. Im Falle der Kreuzung zweier proazulenhaltiger Individuen (47 x 27) konnte das Merkmal „proazulenhaltig" bei 100% der Nachkommen positiv nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der reziproken Kreuzung 19 x 47, bzw. 47 x 19 lassen auf den ersten Blick deutliche Unterschiede zwischen den beiden Nachkommenschaften erkennen. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß die Stichprobengröße bei **4719** nur 17 Individuen umfaßt (s. Tab. 8) S 1180, sodaß die Ergebnisse nicht vorbehaltlos übernommen werden sollten.

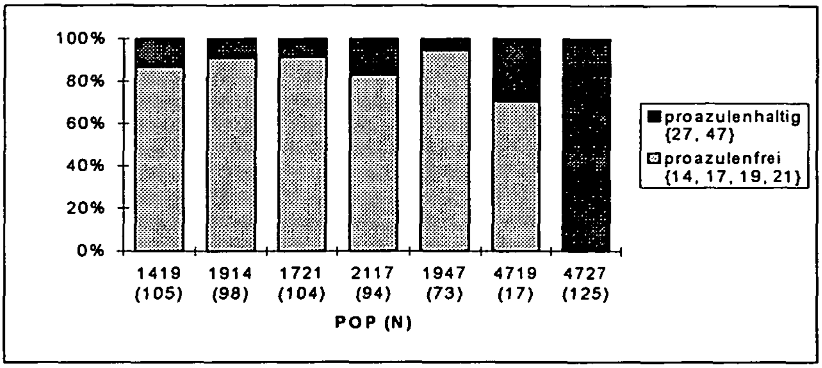


Abb. 14: Qualitativer Proazulennachweis: Relative Verteilung proazulenfreier und proazulenhaltiger Individuen in den F_1-Nachkommenschaften unter Angabe der Stichprobengröße (N).

Die Inhaltsstoffmuster der proazulenfreien Individuen konnten zum Großteil einem der beiden Typen, A1 oder A2, zugeordnet werden (vgl. Tab. 11, S. 1185). Diese Individuen wurden ausgewählt und eine Häufigkeitsverteilung der beiden Typen erstellt (Abb. 15). Mit Ausnahme von **4727** lassen sich beide Typen in allen Nachkommenschaften nachweisen, wobei der Typ A1 stets der häufigere ist. Das Verhältnis der Häufigkeiten liegt durchschnittlich bei 55:45, nur bei **4719** zeigt sich ein 3:1-Verhältnis.

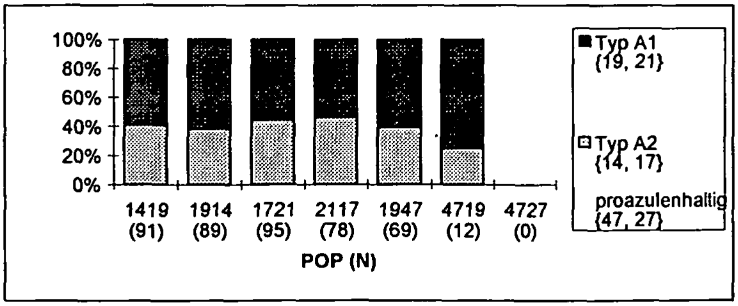


Abb. 15: Relative Verteilung der beiden Inhaltsstofftypen A1 und A2 in den F_1-Nachkommenschaften unter Angabe der Stichprobengröße (N).

Tab. 12: Relative Verteilung der Guajanolidmuster (Proazulene) (in %) bei den proazulenhaltigen Pflanzen der F_1-Nachkommenschaften unter Angabe der Stichprobengröße *(N)*.

POP	*(N)*	(11, 13, 10)	(11, 13)	(11, 10)	(13, 10)	(11)	(13)	(10)	—
1419	*14*	64		29	7				
1914	*9*	44		11	22	22			
1721	*9*	56		11				33	
2117	*16*	56		19	6	6		6	6
1947	*4*	25		50				25	
4719	*5*	100							
4727	*125*	65	30	1	2	1	1		
Typen		B1		B2			B3		—

proazulenhaltige Elternpflanzen...{27, 47}

Bei den proazulenhaltigen F_1-Pflanzen (Tab. 12) trat in (fast) jeder Population der Typ B1 mit den Guajanoliden Achillicin (**11**), Tigloxyartabsin (**10**) und Angeloxyartabsin (**13**) als der häufigste auf, unabhängig davon, ob in den Elternpflanzen dieses Inhaltsstoffmuster zu beobachten war oder nicht (vgl. Tab. 10, S. 1184). Innerhalb des Typs B2 konnte Vergleichbares auch für das (**11**, **10**)-Muster festgestellt werden und stellt einen weiteren Trend in den untersuchten Populationen dar. Im Gegensatz dazu bildeten einige Individuen (30 %) der Nachkommenschaft **4727** als einzige das Proazulenmuster mit (**11**) und (**13**) aus, welches bei der Elternpflanze {27} nachgewiesen wurde. Das (**13**, **10**)-Muster konnte bei Nachkommen sowohl von **1419** und **1914** als auch von **4727** beobachtet werden. Der Typ B3 repräsentiert das Vorkommen jeweils einer der genannten Substanzen allein. Hier zeigt sich, daß Angeloxyartabsin (**13**) allein nur bei F_1-Individuen der **4727**-Nachkommenschaft festgestellt wurde. Darüber hinaus konnte bei einem Individuum der Population **2117** ein anderes als die drei genannten Proazulene nachgewiesen werden.

Während bei den vier erstgenannten F_1-Nachkommenschaften zwischen den reziproken Kreuzungen kaum Unterschiede auftraten, waren bei den beiden F_1-Populationen mit jeweils einem proazulenhaltigen Elter, **1947** und **4719**, sehr deutliche zu beobachten: Im Gegensatz zu **1947** konnte bei **4719** nur der Typ B1 nachgewiesen werden, wobei jedoch in beiden Fällen der Umfang der Stichprobe sehr klein war.

Aufgrund ihres von den Sesquiterpenlactonen abweichenden Grundgerüstes wurden die beiden Derivate Longipinenon (**6**) und Hydroxylongipinenon (**17**) in einer eigenen Gruppe zusammengefaßt. Konnten eines oder beide dieser Derivate nachgewiesen werden, wurde das in einem ersten Schritt als positiver Longipinenonnachweis mit „1" bewertet (Abb. 16). In den F_1-Populationen mit je einem longipinanpositiven Elter (***1419***, ***1914***, ***1721***, ***2117***, ***1947***, ***4719***) zeigte sich ein Verhältnis von 1:1 zwischen longipinanpositiven zu -negativen Individuen, wobei die longipinanpositiven Individuen bei den beiden letztgenannten Nachkommenschaften mit mehr als 50% vertreten sind. Trotz der erwähnten analytischen Schwierigkeiten bei der Detektion von (**17**) wurde dieses Derivat in keinem F_1-Individuum von **4727** nachgewiesen, während der

positive Nachweis von (6) für alle Hybriden dieser Nachkommenschaft ausgeschlossen werden kann (s. unter Kap. Phytochemische Untersuchungen, S. 1177).

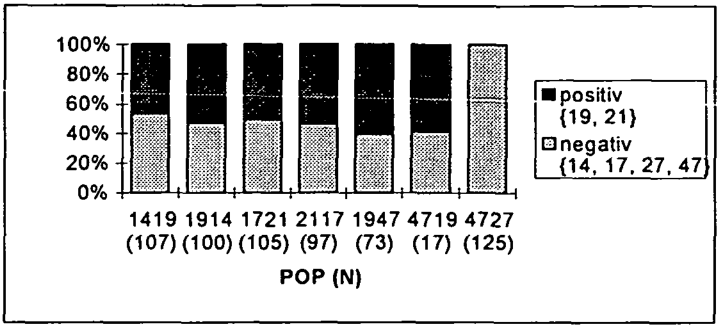


Abb. 16: Qualitativer Longipinenonnachweis: Relative Verteilung positiver und negativer Individuen in den F_1-Nachkommenschaften unter Angabe der Stichprobengröße (N).

Wie bereits unter Kap. Inhaltsstofftypen und deren Stoffmuster .... (S. 1184f.) erwähnt, konnten innerhalb der longipinanpositiven F_1-Individuen drei Typen unterschieden werden (Abb. 17): Typ L1 mit (6) kam am häufigsten vor, Typ L3 mit dem (6, 17)-Muster folgte in der Häufigkeit des Auftretens an zweiter Stelle. Eine Ausnahme bildeten in dieser Hinsicht die beiden Populationen **2117** und **4719**: Hier stand an zweiter Stelle der Typ L2 mit Hydroxylongipinenon (17), welcher sonst mit der geringsten Häufigkeit auftrat.

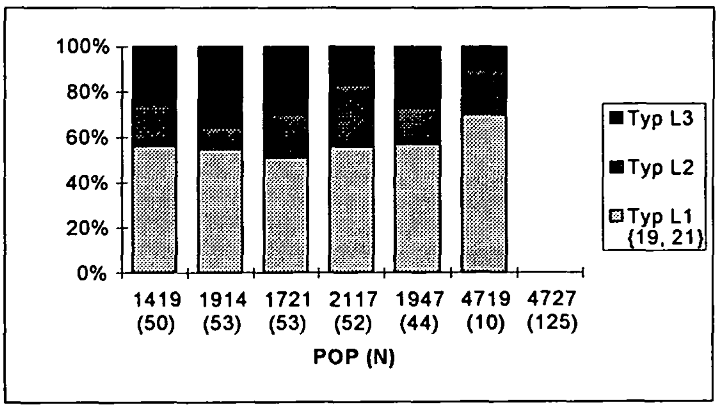


Abb. 17: Relative Verteilung der drei Longipinenontypen in den einzelnen F_1-Nachkommenschaften unter Angabe der Stichprobengröße (N).

Morphometrische Untersuchungen

Für die morphologischen Untersuchungen konnten nur von einer geringen Anzahl von F_1-Individuen Herbarbelege angelegt und ausgewertet werden, eine größere Stichprobe stand jedoch für die Beobachtung der Pollendurchmesser (PDMS) und Zungenblütenmerkmale (ZBCRL, ZBZL, ZBZB)[4] zur Verfügung.

Der Vergleich der Elternindividuen (Tab. 13) zeigte deutliche Unterschiede zwischen {14}, *A. pratensis*, und {47}, *A. ceretanica*, während {19}, *A. distans* subsp. *styriaca*, eine intermediäre Stellung zwischen diesen beiden einnahm. Besonders deutlich waren sie bei den Merkmalen Fiederabstand (FAB), Fiederendzipfelbreite (FEZB), Fiederlänge (FLSM) und I_FEZ (=FEZL/FEZB) zu erkennen. Bei {47} zeigten alle Variablen außer der Internodienlänge (INL) kleinere Meßwerte als die beiden anderen Individuen.

Tab. 13: Statistisch signifikante Unterschiede in einigen morphologischen Merkmalen zwischen den F_1-Populationen (unter Angabe der jeweiligen Stichprobengröße) im Vergleich mit den Werten der Elternpflanzen.

Merkmal*	(Einheit)	{14}	{19}	{47}	**1419**	**1914**	**1947**	**4719**
BLBO	mm	24	20	16	A	A	AB	B
BL_AREA	21 mm²	1536	1340	1008	A	AB	AB	B
FAB	mm	5,00	3,88	2,25	A	AB	BC	C
FBSM	mm	9,26	7,50	4,95	A	AB	B	B
FEZB	mm	667	491	444	A	A	AB	B
FLSM	mm	14,26	10,83	8,75	A	AB	BC	C
FRB	mm	1093	903	491	A	A	AB	B
FZZMAX		16	23	15	A	A	AB	B
FZZMIN		15	20	12	A	A	AB	B
INL	mm	23,6	27,1	32,3	A	A	AB	B
I_FEZ		1,22	1,57	2,91	A	A	AB	B
PDMS	mm	33,97	31,55	26,97	A	A	B	B

*...s. Kap. Morphometrische Untersuchungen, S. 1189
{14}...*A. pratensis*, {19}...*A. distans* subsp. *styriaca*, {47}...*A. ceretanica*

Stichprobengrößen:

Merkmale	**1419**	**1914**	**1947**	**4719**
BLBO, FAB, FBSM, FEZB, FLSM, FRB, FZZ, INL, I_FEZ	9	7	15	9
PDMS, ZBCRL, ZBZL, ZBZB	32	28	31	16

---

4 Für diese Merkmalsgruppe war die Varianzhomogenität nicht gegeben. Somit wurden die statistischen Analysen mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Da das Individuum {19} für jede der untersuchten F_1-Populationen als Elter zur Verfügung stand, wurden die vier Nachkommenschaften **1419, 1914, 1947** und **4719** zusammen verglichen. In der Tabelle 13 sind die signifikanten Unterschiede zwischen den Populationen durch einzelne, verschiedene Buchstaben gekennzeichnet. Zwei Buchstaben drücken Ähnlichkeiten zu den entsprechend gekennzeichneten anderen Nachkommenschaften aus. So waren sich die Individuen von **1419** und **1914** z.B. in der Blattbreite (BLBO) ähnlich, unterschieden sich jedoch deutlich von den **4719**-Hybriden. Die F_1-Nachkommen von **1947** dagegen zeigten Ähnlichkeiten zu denen sowohl von **1419** und **1914** als auch von **4719**.

Die bei den Elternpflanzen festgestellten Unterschiede spiegelten sich in den vier untersuchten F_1-Populationen wieder. So unterschieden sich **1419** und **4719** in allen untersuchten Merkmalen signifikant, während **1914** und vor allem **1947** eine intermediäre Stellung zwischen diesen beiden Nachkommenschaften einnahmen. Dies war besonders deutlich bei den beiden Merkmalen Fiederabstand (FAB) und Fiederlänge (FLSM) zu beobachten.

Zu ähnlichen Ergebnissen führten auch die Untersuchungen der Pollendurchmesser (PDMS) und Zungenblütenmerkmale (ZBCRL, ZBZL, ZBZB) (Tab. 14; Abb. 18, S. 1191). Dabei kennzeichnen in der Tabelle die verschiedenen Buchstaben Merkmale, bei denen signifikante Unterschiede zwischen den Hybridpopulationen **1419, 1914, 1947** und **4719** bestehen. So unterschieden sich z.B. **1419** und **1914** im Pollendurchmesser (Merkmal A...PDMS) signifikant von **1947** und **4719**, während entsprechende Unterschiede der Zungenbreite der Züngenblüte (D...ZBZB) nur zwischen **1419** und **1947**, bzw. **4719** festgestellt werden konnten.

Tab. 14: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen F_1-Nachkommenschaften in einigen morphologischen Merkmalen.

	1419	**1914**	**1947**
1947	ACDE	AE	—
4719	AD	AB	BE

A...PDMS; B...ZBCRL; C...ZBZL; D...ZBZB;
E...I_ZB1 (ZBCRL/ZBZL); F...I_ZB2 (ZBZL/ZBZB)

Zunächst fiel auf, daß nur beim Pollendurchmesser (PDMS) eine klare Trennung zwischen den beiden Nachkommenschaftsgruppen **141914** und **194719**) erkennbar war.

In den Zungenblütenmerkmalen existierten zwischen den beiden reziproken Kreuzungen **1419** und **1914** kaum Unterschiede, obwohl die beiden Elternindividuen {14} und {19} insbesondere in der Zungenbreite (ZBZB) voneinander verschieden waren. In den F_1-Nachkommenschaften ließen sich jedoch nur an die von {19} angenäherten Werte wiederfinden. Ähnliches wurde auch bei den beiden anderen Merkmalen

(ZBCRL, ZBZL) beobachtet. Es ist jedoch zu beachten, daß die für {14} (*A. pratensis*) angegebenen Meßwerte an der unteren Grenze der für diese Art beschriebenen Variationsbreite liegen (SAUKEL & LÄNGER 1992a).

Zwischen den beiden anderen reziproken Nachkommenschaften, **1947** und **4719**, ließen sich in der Corollröhrenlänge (B...ZBCRL) und in weiterer Folge dem Index (E...I_ZB1) deutliche Unterschiede bestimmen. In der Zungenbreite (ZBZB) hingegen waren keine Unterschiede festzustellen. Interessant war, daß die Indexwerte I_ZB2 (ZBZL/ZBZB) von **4719** sehr gut mit dem von {47} vergleichbar sind, während sie in der reziproken Nachkommenschaft an die von {19} angenähert erscheinen. Darüber hinaus waren die Indexwerte für ZBCRL/ZBZL immer kleiner 1, wie sie für den Großteil der Sippen des *Achillea millefolium*-Komplexes typisch sind (SAUKEL & LÄNGER 1992c).

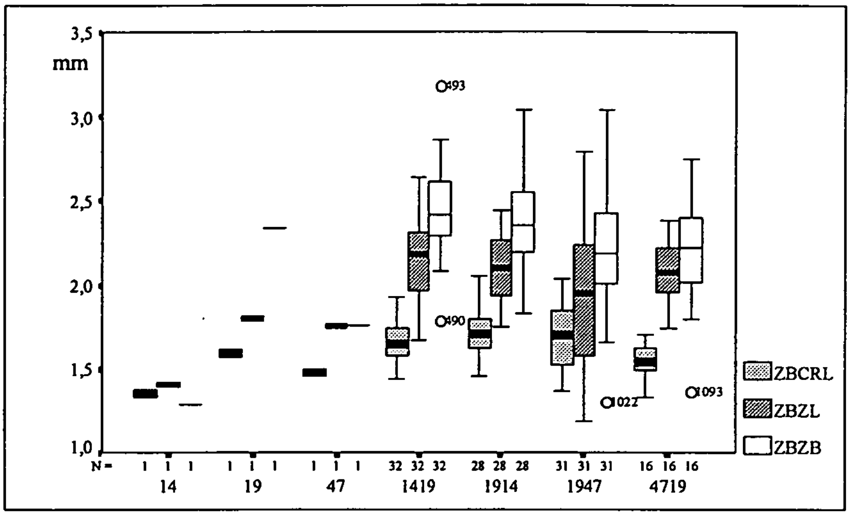


Abb. 18: Vergleich der Zungenblütenmerkmale dreier Elternpflanzen und deren F_1-Kreuzungsnachkommenschaften unter Angabe der Stichprobengröße (N).

Im Zuge der intensiven Bearbeitung der *Achillea millefolium*-Gruppe konnten von SAUKEL & LÄNGER (1992c) positive Korrelationen zwischen den Merkmalen Internodienlänge (INL), Fiederabstand (FAB) und Fiederrhachisbreite (FRB) festgestellt werden. Dieser Zusammenhang wurde bei den hier untersuchten F_1-Hybriden ebenfalls gefunden.

Diskussion

Kreuzungsexperimente

Mehrere Kreuzungsversuche haben gezeigt, daß zwischen den diploiden *Achillea*-Arten deutliche Kreuzungsbarrieren existieren, die bei Polyploiden geringer sind oder völlig zurücktreten (EGLSEER 1990, EHRENDORFER 1957, 1959, JEZEK 1989). Bei Polyploiden sind häufig Hybridschwärme zu beobachten (SAUKEL & LÄNGER 1992a, WAGENITZ 1979), wobei Individuen sowohl der gleichen als auch verschiedener Ploidiestufen miteinander bastardisieren können (EHRENDORFER 1963, HIESEY & NOBS 1970). Dadurch wird u.a. die Artabgrenzung innerhalb des *Achillea millefolium*-Komplexes erschwert.

Für die Durchführung der Kreuzungsexperimente wurde davon ausgegangen, daß die homogenetische Inkompatibilität bei den verwendeten Sippen sehr hoch ist. Dies bestätigen sowohl vorangegangene Versuche (EGLSEER 1990, JEZEK 1989) als auch eigene, mit den Elternpflanzen durchgeführte Selbstungen, welche bisher kein (bzw. kein keimfähiges) Saatgut erbrachten. Somit ist anzunehmen, daß bei der künstlichen Bestäubung der Blüten (s. Kap. Kreuzungsversuche, S. 1176) nur jeweils fremde Pollenkörner auf den Narben der mütterlichen Pflanzen keimten. Andererseits konnte GRAHLE bereits 1952 von einer Nachkommenschaft aus einer Selbstung berichten, während Kreuzungen zu keinen Ergebnissen geführt haben sollen.

Die Saatguterträge mit 100-200 Achänen/Infloreszenz fielen insgesamt gut aus (s. Tab. 8, S. 1180). Grundsätzlich bestätigt dies, daß Hybridisierungen zwischen den erwähnten Sippen vorkommen (können), wie dies von Beobachtungen natürlich vorkommender Populationen bereits bekannt ist (s.o.).

Bei der Kreuzung 47 x 19 mit nur 17 F_1-Individuen könnten interspezifische Kreuzungsbarrieren Ursache für den geringen Samenansatz sein. Nicht auszuschließen ist, daß es bei wiederholten Bestäubungsversuchen zu Verletzungen der Narben gekommen sein kann.

Dünnschichtchromatographische Analysen

Aufgrund der hohen Anzahl an zu untersuchenden F_1-Hybriden stellte die dünnschichtchromatographische Analyse der Blütenköpfchenextrakte die Methode der Wahl dar. Dazu wurde eigens für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ein Laufmittelgemisch entwickelt (s. Kap. Dünnschichtchromatographische Analysen, S. 1181), wobei die Zuordnung zu Reinsubstanzen mittels zweidimensionaler DC in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakognosie der Universität Wien durchgeführt wurde.

Parallel zu den hier durchgeführten Untersuchungen wurden im Rahmen des Projektes 113 F_1-Nachkommen aus **1419**, **1914**, **1947** und **4719** mit DC und GC-FID (tlw. GC-MS) untersucht (WELZEL 1995). Dabei wurden sowohl Bestandteile des ätherischen Öles als auch nichtflüchtige Sesquiterpen/lacton/e erfaßt. Es zeigte sich, daß die Ergebnisse der gaschromatographischen Analysen im Bereich von 40-80 Minuten der Chromatogramme mit den Aussagen der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen beinahe zu 100% korrelieren und auch mit den Daten der vorliegenden Arbeit gut verglichen werden können.

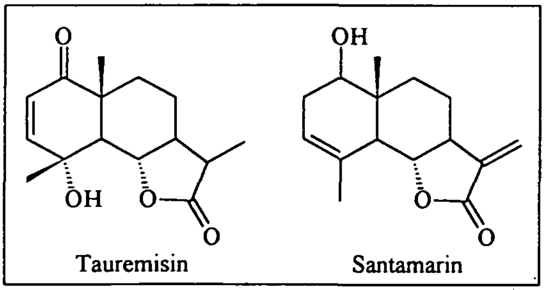


Abb. 19: Strukturformeln der beiden Eudesmanolide Tauremisin und Santamarin.

Darüber hinaus konnte WELZEL zwei weitere Eudesmanolide, Tauremisin und Santamarin (Abb. 19), in zahlreichen Hybriden nachweisen. Diese Verbindungen stellen keine Markersubstanzen dar und wurden in der vorliegenden Arbeit auch nicht erfaßt. Zudem läßt sich Tauremisin dünnschichtchromatographisch nur in sehr hohen Konzentrationen nachweisen (GLASL 1995).

Während die qualitative Analyse von Longipinenon (**6**) ohne Schwierigkeiten durchgeführt werden konnte, muß der positive Nachweis von Hydroxylongipinenon (**17**) vor allem bei proazulenhaltigen Pflanzen kritisch bewertet werden, da andere Derivate mit dem gleichen hRf-Wert diese Substanz überlagern können. Dies gilt im speziellen für entsprechende Individuen der beiden Gruppen **194719** und **4727**.

Zur Meiose tetraploider Pflanzen

Bei tetraploiden Pflanzen ist grundsätzlich zwischen Auto- und Allotetraploiden zu unterscheiden. Im idealen Fall können während der Meiose I bei Autotetraploiden alle Chromosomen miteinander hybridisieren, bei Allotetraploiden paaren nur jeweils die homologen Chromosomen der beiden Genome miteinander. Tatsächlich finden sich zwischen diesen beiden Extremen Übergänge.

In der Regel werden diese beiden Typen an der Anzahl der Multivalente während der Meiose I unterschieden. Trotzdem ist die Schlußfolgerung „keine Multivalente → keine Autopolyploidie" nicht zulässig, da z.B. bei der autohexaploiden Art *Phleum pratense* L. nur Bivalente in der Meiose I beobachtet wurden. Zum anderen ist von allohexaploiden Weizensorten bekannt, daß ein Gen für die Bivalentbildung verantwortlich ist. Mit dem Fehlen desselben sind Multivalentbildungen zu beobachten

(vgl. CAUDERON 1986). Somit ist der Hypothese „Bivalente → allopolyploid" auch nicht uneingeschränkt zuzustimmen. Die Erfahrung zeigt aber, daß sich Allotetraploide während der Meiose I ähnlich diploiden Organismen verhalten (Amphidiploidie) und eine Interpretation der Spaltungsmuster quasi auf diploidem Niveau möglich ist (WRICKE & WEBER 1986). Somit könnten beobachtete Spaltungsmuster entsprechende Rückschlüsse erlauben.

Nach bisherigen Beobachtungen sind bei polyploiden Schafgarben während der Meiose I hauptsächlich Bivalente zu beobachten (EHRENDORFER 1957, LOIDL et al. 1990, REHBERGER et al. 1994). Wenngleich man für die Elternpflanzen Allotetraploide annehmen kann, stehen bestätigende Untersuchungen noch aus.

Vererbung der Inhaltsstofftypen

Innerhalb des Themenkreises „Vererbung bioaktiver Naturstoffe" gibt es eine Reihe von experimentellen Ergebnissen über die Vererbung von Alkaloiden (z.B. *Papaver*, *Lupinus*) sowie von Bestandteilen ätherischer Öle (z.B. *Mentha*, *Ocimum*, *Perilla*, *Thymus*, *Salvia*).[5] Zusammenfassend treten dabei zwei Aspekte in den Vordergrund:

(1) Die Biogenese von Naturstoffen ist stark genetisch determiniert, über die Substanzklassen hinaus bis hin zur Ausbildung von Stereoisomeren (z.B. MURRAY et al. 1980, RAJAONARIVONY et al. 1992).

(2) Zwischen reziproken Nachkommen, bzw. Nachkommenschaften bestehen in der Regel keine qualitativen Unterschiede in den Inhaltsstoffmustern, bzw. -typen (z.B. GUPTA 1994, KOEZUKA et al. 1986). Dies läßt auf eine kerngenetische Regulierung solcher Erbgänge schließen (BUSCHMANN & SPRING 1993).

Unter diesen Voraussetzungen werden im Folgenden jeweils beide Nachkommenschaften der reziproken Kreuzungen zusammengefaßt (**141914**, **172117**, **194719** und **4727**), da eigene Ergebnisse in der Verteilung der Inhaltsstoffmuster (s. S. 1185ff.) keine deutlichen Unterschiede zwischen den reziproken Nachkommenschaften zeigen. Sind dennoch deutliche Unterschiede zu beobachten, so sind diese in erster Linie auf den geringen Umfang der Stichproben zurückzuführen. Damit soll versucht werden,

- Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den reziproken Nachkommenschaftsgruppen verschiedener Eltern aufzuzeigen,
- Interpretationsmöglichkeiten der beobachteten Aufspaltungen anzubieten,
- anhand eines sehr vereinfachten Biogeneseschemas eventuelle Schlüsselpositionen in der Biosynthese zu kennzeichnen.

---

[5] Zudem finden in der Pflanzenzüchtung bioaktive Naturstoffe immer häufiger als effektive Selbstschutzmechanismen der Pflanzen Berücksichtigung (vgl. WINK 1988). Darüber hinaus wird bereits versucht, mittels gentechnischer Methoden die Biogenese einzelner Derivate gezielt zu beeinflussen (z.B. SMITH et al. 1988; KENNEDY et al. 1993; CARRON et al. 1994).

Die Vermutung, daß die Elternindividuen - von Naturstandorten gesammelt - heterozygot sein müssen, findet Bestätigung in der Aufspaltung in verschiedene Inhaltsstofftypen in den F_1-Populationen. Dies legt nahe, daß es sich bei den Elternindividuen um eine heterozygote F_x-Generation handelt und sich deshalb die nächste Generation höchstwahrscheinlich ähnlich einer F_2 verhält und aufspaltet.

Ebenso wie bei der Diplomarbeit von WELZEL (1995) konnte auch im Rahmen dieser Arbeit eine Vielzahl an Stoffmustern beschrieben werden (s. Kap. Inhaltsstofftypen und deren Stoffmuster..., S. 1184f.). Im Gegensatz zu WELZEL sollen hier aber die Spaltungsmuster jeweils für die verschiedenen Derivatengruppen diskutiert werden, da sich so (mögliche) biogenetische Zusammenhänge besser darstellen lassen.

Proazulenogene Guajanolide

Nachdem STAHL 1952 für *Achillea* den Nachweis erbracht hatte, daß die Bildung von Azulen genetisch fixiert ist, folgten bei Kamille detailliertere Untersuchungen zu dieser Fragestellung mit dem Ergebnis, daß das Merkmal „azulenhaltig" rezessiv vererbt wird (FRANZ & WICKEL 1985, HORN et al. 1988, TETENYI 1961).

Faßt man nun in der vorliegenden Untersuchung jeweils die beiden reziproken Nachkommenschaften zusammen (s.o.), so sind in den drei Nachkommenschaftsgruppen **191419, 172117, 194719** je ca. 10% proazulenhaltige F_1-Pflanzen zu finden (Abb. 20), unabhängig davon, ob die Elternpflanzen proazulenhaltig sind oder nicht. Daß nun (1.) bei **194719** der geringere Teil der Gruppe proazulenführend ist und (2.) Nachkommen proazulenfreier Eltern (**191419, 172117**) proazulenhaltig sein können, erhärtet die Annahme, daß das Merkmal „proazulenhaltig" auch bei *Achillea* rezessiv vererbt wird. Dies findet eine Bestätigung in dem Ergebnis, daß bei **4727** 100% der Nachkommen proazulenhaltig sind, wie es für den Vererbungsgang eines rezessiven Merkmales nicht anders zu erwarten ist.

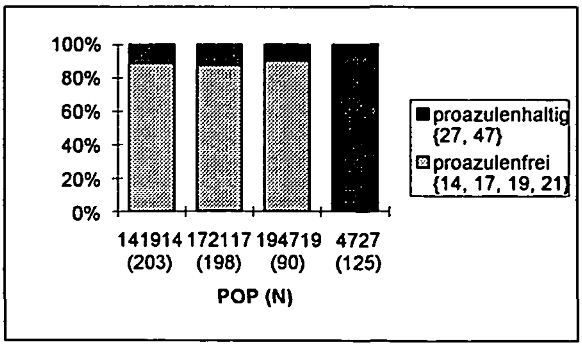


Abb. 20: Qualitativer Proazulennachweis: Relative Verteilung der beiden Typen in den reziproken F_1-Nachkommenschaften unter Angabe der Stichprobengröße (N).

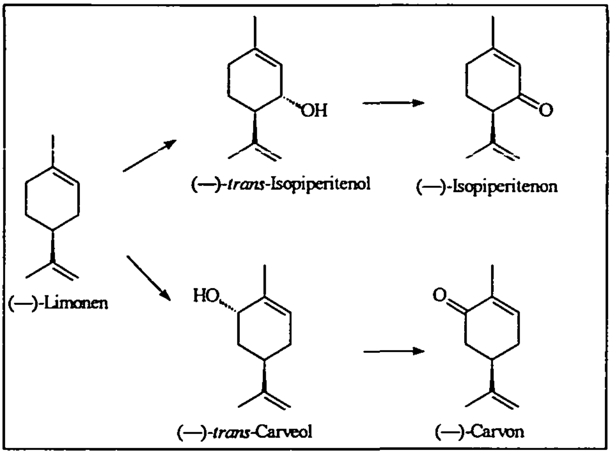


Abb. 21: Umsetzung von (—)-Limonen zu C_3- und C_6-oxygenierten Monoterpenen in *Mentha* (CROTEAU 1991).

Bei keinem der hier untersuchten F_1-Nachkommen konnten mit der verwendeten qualitativen Analysenmethode (s. Kap. Phytochemische Untersuchungen, S. 1177ff.) Eudesmanolide und proazulenogene Guajanolide nachgewiesen werden, d.h. die beiden Typen „proazulenfrei" und „proazulenhaltig" schließen einander aus. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß die intramolekulare Cyclisierung des Germacranolids eine Schlüsselposition einnimmt („Proazulenschalter"), wobei entweder Eudesmanolide oder Guajanolide gebildet werden (vgl. Abb. 1, S. 1166: **(E)** → **(F)**, bzw. **(E)** → **(G)**).

Enzyme, welche die Biosynthese in die eine oder andere Richtung lenken, sind bei *Mentha* genauer untersucht worden (z.B. CROTEAU et al. 1986, MURRAY et al. 1980, RAJAONARIVONY et al. 1992, vgl. FRANZ 1993). So wird z.B. (—)-Limonen in *M. x piperita* L. zu C_3-oxygenierten Substanzen (z.B. (—)-Isopiperitenon), in *M. ƒcrispa* zu C_6-oxygenierten Derivaten (z.B. (—)-Carvon) umgesetzt (Abb. 21), wobei sich die beiden (—)-Limonen-Hydroxylasen nur geringfügig voneinander unterscheiden (CROTEAU 1991).

Entgegen den oben erwähnten Beobachtungen konnte mittels GC-FID bei den beiden proazulenhaltigen F_1-Individuen {509} und {510} aus der Kreuzung 14 x 19 neben Proazulenen auch geringe Mengen an Eudesmanoliden nachgewiesen werden (WELZEL 1995). Vergleichsweise konnten BUSCHMANN & SPRING (1993) bei Nachkommen dialleler Kreuzungen zwischen *Helianthus*-Arten Sesquiterpenlactone der Mutter- <u>und</u> der Vaterpflanze nachweisen. Ein derartiger additiver Effekt konnte bei den untersuchten F_1-Hybriden im allgemeinen jedoch nicht festgestellt werden (vgl. Tab. 10 und Tab. 11, S. 1184f.).

Ferner scheinen auch Umwelteinflüsse die Ausbildung der einen oder anderen Derivatengruppe zu beeinflussen. So berichteten FIGUEIREDO et al. (1992a, 1992b) von *Achillea millefolium* L. subsp. *millefolium*, daß geklonte Pflanzen[6] nur an einem Standort Proazulene in nachweisbaren Mengen ausbildeten. Weiters konnten in den Blütenköpfchen von *Artemisia douglasiana* BESS. (*Asteraceae*) im Frühjahr Eudesmanolide (Arglanin, Douglanin) nachgewiesen werden, im Herbst jedoch wurden aus dem Material derselben Pflanze[7] Guajanolide (Arteglasin A und B) isoliert (LEE et al. 1971).

Somit scheint die Tendenz zur Akkumulation entweder von proazulenogenen Guajanoliden oder von Eudesmanoliden innerhalb der *A. millefolium*-Gruppe genetisch determiniert. Weiters kann sie scheinbar auch noch durch äußere Faktoren beeinflußt werden. In wie weit dies der Fall ist, müßten gezielte Untersuchungen zeigen.

Daß proazulenhaltige Individuen in den Nachkommenschaften proazulenfreier Elternpflanzen gefunden wurden, legt weiters die Vermutung nahe, daß es proazulenhaltige Individuen innerhalb als proazulenfrei geltender Taxa (z. B. *A. pratensis*) geben muß (vgl. SAUKEL & LÄNGER 1992a). Darüber hinaus kann z. B. *A. collina* als ein typisch proazulenführendes Taxon erklärt werden, da ein rezessiv vererbtes Merkmal, welches von beiden Eltern weitergegeben wird, nur derartige Phänotypen zuläßt.

Unter der Annahme, daß nur homozygot rezessive Typen (*pppp*) proazulenogene Guajanolide ausbilden können, soll nun versucht werden, für tetraploide Individuen die beobachteten Verhältnisse mittels eines Punnett'schen Quadrates rekonstruieren (Tab. 15). Dabei ergeben sich für allotetraploide Pflanzen mit einem oder mehreren crossing-over zwischen den homologen Chromosomen derselben Genome folgende Gametenverhältnisse: PPxpp PP pp führt zu Pp:pp (1:1), bei PPxpp PPxpp ergeben sich Gameten PP:Pp:pp im Verhältnis von 1:2:1. Damit lassen sich in der Nachfolgegeneration homozygot rezessive Genotypen mit einer Häufigkeit von 12.5% rekonstruieren.

Tab. 15: Rekombinationsmöglichkeiten von Gameten zur Bildung des Merkmales „proazulenhaltig".

PPxpp	pp pp	PPxpp	PPxpp	
	PP	2Pp	pp	
Pp pp			 pppp	 12.5%
pp pp	pp pp	PPxpp	PP pp	
	PP	2Pp	pp	
pp			pppp	25%

[6] "The plants in the Canecao Garden of Almada originated from explants of plants growing in the Botanical Garden of Lisbon."

[7] "The mature plant was that growing on the same rootstock from which the spring growth was collected. ..."

Tab. 16: 1χ^2-Werte für die geprüften Verhältnisse der verschiedenen Inhaltsstofftypen bei drei Nachkommenschaftsgruppen.

	Typen			141914	172117	194719
Proazulen	-	+				
	7	1		0.3651	0.0028	—
proazulenfrei	A1	A2				
	9	7		1.3559	0.1256	1.4832
Longipinane	-	+				
	1	1		0.0048	0.3168	3.6000
	7	9		3.5446	1.4965	0.5143
	L1	L2	L3			
	9	3	4	2.9935	1.1630	0.2305

Prüft man die beobachteten Verhältnisse mittels χ^2-Test, so erhält man für ein Verhältnis von 7:1 bei **141914** und **172117** sehr gute Werte (Tab. 16). Bei **194719** jedoch kann {47} nur eine Sorte von Gameten bilden (pp). Damit ergibt sich ein Verhältnis von 3:1, welches jedoch nur bei der zahlenmäßig kleinen F_1-Population **4719** zu beobachten war.

Innerhalb der proazulenführenden Individuen ergibt sich für die einzelnen Guajanolidmuster bei der Zusammenfassung der F_1-Populationen zu Nachkommenschaftsgruppen keine wesentliche Änderung zu Tab. 12 (S. 1187). Jedoch muß hervorgehoben werden, daß der Guajanolidtyp B1 mit Achillicin (**11**), Angeloxyartabsin (**13**) und Tigloxyartabsin (**10**) in **194719** und **4727** mit zumindest einem proazulenhaltigen Elter um ca. 10% häufiger als in den beiden anderen Gruppen zu beobachten ist. Ferner ist (**13**) in **4727** mit 98% sehr viel öfter als in den anderen F_1-Nachkommenschaften, das Muster mit (**11**) und (**13**) nur in dieser Population nachgewiesen worden.

Daraus läßt sich folgern, daß auch die Ausbildung der einzelnen Proazulenmuster genetisch determiniert ist. Voraussetzung dafür ist jedoch, daß ein „Proazulenschalter" die Biogenese überhaupt in diese Richtung lenkt. Vergleichsweise ist die Reduktase, welche (—)-Isopiperitenon zu (+)-*cis*-Isopulegon umsetzt sowohl in der Krauseminze als auch in *M. piperita* nachgewiesen worden. Allerdings findet sie nur in letzterer das geeignete Substrat, da sie hochselektiv Derivate mit der $\Delta^{1,2}$-3-Keto-Gruppe umsetzt (CROTEAU 1991). Diese entsprechende Vorstufe wird aber ausschließlich durch die (—)-Limonen-Hydroxylase von *M. piperita* zur Verfügung gestellt (vgl. Abb. 21, S. 1196).

Als Hinweis auf die mögliche cytoplasmatische Beeinflussung bei der Vererbung der hier untersuchten proazulenogenen Guajanolide könnten die Ergebnisse von **1947** und **4719** verstanden werden, da in letztgenannter F_1-Population ausschließlich der Typ B1 detektiert wurde. Jedoch erlaubt die sehr geringe Stichprobengröße zur Zeit keine eindeutige Beurteilung. In diesem Zusammenhang ist es sehr bedauerlich, daß die reziproke Kreuzung zu 47 x 27 keine Nachkommen ergab, da es von großem In-

teresse gewesen wäre, ob das (**11**, **13**)-Muster mit gleicher oder anderer Häufigkeit in dieser Nachkommenschaft festgestellt hätte werden können.

Proazulenfreie Inhaltsstofftypen

Bei den proazulenfreien Individuen lassen sich die beiden Inhaltsstofftypen A1 und A2 (mit **S4**, bzw. Hydroperoxyarglanin (**2**) als Leitsubstanzen) unterscheiden. Vergleicht man die Häufigkeiten der beiden Typen bei **141914**, **172117**, **194719** (vgl. Abb. 15, S. 1186), so ist jeweils ein Verhältnis von 9:7 (Typ A1:A2) gegeben (vgl. Tab. 16, S. 1198). Dies gilt auch für **194719**, obwohl {47} proazulenhaltig ist.

Analog zu den Ergebnissen der proazulenogenen Sesquiterpenlactone muß hier offensichtlich der „Proazulenschalter" deaktiviert sein, um in weiterer Folge die Synthese von Eudesmanoliden zu ermöglichen. So ist auch Santamarin (Abb. 19, S. 1193) nur in proazulenfreien Individuen nachgewiesen worden (WELZEL 1995).

In diese Gruppe wurden aber auch jene F_1-Individuen gestellt, bei denen neben Longipinenonderivaten nur die unbekannte Verbindung **S5** nachgewiesen werden konnte (Typ A3, s. Tab. 11, S. 1185). Dieses Inhaltsstoffmuster, zweifelsohne die interessanteste Rekombination, macht deutlich, daß neben Guajanoliden oder Eudesmanoliden auch noch ganz andere Biogeneseschritte möglich sind.

Longipinenonderivate

Da sowohl bei proazulenhaltigen als auch bei proazulenfreien F_1-Pflanzen Longipinenonderivate nachgewiesen werden konnten, kann angenommen werden, daß diese Derivate unabhängig von den Sesquiterpenlactonen vererbt werden. Vererbungsstudien bei *Matricaria chamomilla* haben gezeigt, daß das proazulenogene Sesquiterpenlacton Matricin unabhängig von Bisaboloiden vererbt wird (FRANZ & WICKEL 1985, HORN et al. 1988).

Die beobachteten 1:1-Verteilungen zwischen longipinenonpositiven bzw. -negativen Individuen in den reziproken Nachkommenschaftsgruppen wurden durch den χ^2-Test ($p<5\%$) bestätigt. Für **194719** erhält man allerdings bessere F-Werte, wenn auf ein Verhältnis von 9:7 geprüft wird (Tab. 16, S. 1198).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von WELZEL (1995) konnte Hydroxylongipinenon (**17**) sowohl alleine (Typ L2) als auch zusammen mit Longipinenon (**6**) (Typ L3) beobachtet werden. Die Verteilung der insgesamt drei Longipinenontypen (s. S. 1184ff.) zeigt dann in den F_1-Nachkommenschaftsgruppen **141914**, **172117** und **194719** ein 9:3:4-Verhältnis (Abb. 22). Eine ebenfalls mit dem χ^2-Test ($p<5\%$) durchgeführte Überprüfung bestätigt diese beobachteten Werte (Tab. 16, S. 1198). Eine Erklärung für die Übereinstimmung in den drei Gruppen ist wiederum möglich, wenn in der Biogenese dieser beiden Derivate ein vorgeschalteter „Longipinenonschalter" angenommen wird.

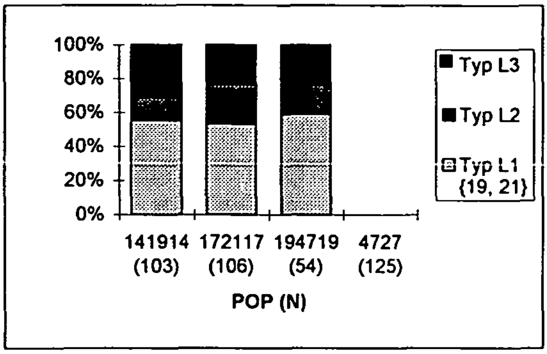


Abb. 22: Relative Verteilung der Longipinenontypen in den reziproken F_1-Nachkommenschaften unter Angabe der Stichprobengröße (N).

Da sowohl bei {27} als auch bei {47} mittels GC keine Longipinenone nachgewiesen werden konnten (GLASL 1995), ist es nicht weiter verwunderlich, daß in **4727** trotz der erwähnten analytischen Schwierigkeiten keine derartigen Derivate detektiert werden konnten.

Das Spaltungsverhältnis von 9:3:4 für L1:L2:L3 kann auf diploidem Niveau mit Epistasie erklärt werden, wobei zwei Gene ein Merkmal beeinflussen. Im vorliegenden Fall werden aber zwei Merkmale, nämlich Longipinenon (6) und sein Hydroxyderivat (17), beobachtet.

Für die Longipinenone stellt sich die Frage, ob beide Derivate aus einer Vorstufe entstehen, welche jedoch nicht erfaßt wurde, oder ob (6) durch Dehydroxylierung aus (17) - oder umgekehrt durch Hydroxylierung - entstehen kann.

Die erste Möglichkeit könnte mit multipler Allelie erklärt werden, wobei dem Typ L3 ein Gleichgewicht von je zwei Allelen L^6 für (6) und L^{17} für (17) zu Grunde liegt. Bei *Mentha* konnten damit unterschiedliche Verhältnisse von (—)-Menthon : (+) - Isomenthon erklärt werden (MURRAY et al. 1980).

Bei der zweiten Möglichkeit kann für den Umsetzungsschritt ein Gen (Enzym) angenommen werden, wobei der Typ L3 mit (6) und (17) durch einen Gen-Dosis-Effekt erklärt werden könnte: LL LL für Typ L1 (6), LL ll für Typ L3 (6, 17), ll ll für Typ L2 (17). Wie aus der quantitativen Genetik bekannt, bewirkt ein Gen-Dosis-Effekt ein „mehr" an Produkt, nicht aber - wie in diesem Fall - die Entstehung eines neuen Derivates. Allerdings wurde mit diesem Modell bei *Perilla frutescens* (L.) BRITT. die Ausbildung dreier Typen (Perillaldehyd; Limonen und Perillaldehyd; keines der beiden Derivate) erklärt (KOEZUKA et al. 1986).

Morphologische Ergebnisse

Generell zeigen die morphologischen Merkmale in den untersuchten F_1-Nachkommenschaften eine große Variationsbreite, wie sie für die verschiedenen Sippen der *A. millefolium*-Gruppe typisch ist (vgl. SAUKEL & LÄNGER 1990).

Im Gegensatz zur Vererbung der Sesquiterpene konnten bei den morphologischen Merkmalen tendenzielle Unterschiede zwischen den reziproken F_1-Populationen gefunden werden. Diese sind zwischen **1947** und **4719** deutlicher als zwischen **1419** und **1914** ausgeprägt. Das liegt daran, daß sich die beiden Elternpflanzen {14}, *A. pratensis*, und {19}, *A. distans* subsp. *styriaca*, nicht sehr deutlich voneinander unterscheiden, während {47}, *A. ceretanica*, von den beiden erstgenannten klar differenziert werden kann (vgl. Tab. 13, S 1189). Aus „Verschiedenheiten zwischen den reziproken F_1-Serien" von *A. aspleniifolia* x *A. setacea* hatte EHRENDORFER bereits 1963 auf den möglichen cytoplasmatischen Einfluß bei der Vererbung morphologischer Merkmale hingewiesen. Dieser Einfluß auf die Vererbung morphologischer Merkmale ließe sich daher noch besser studieren, wenn sehr unterschiedliche Typen miteinander gekreuzt würden. Andererseits beobachteten HIESEY & NOBS (1970) einheitliche F_1-Populationen, die erst in der Folgegeneration in verschiedene Habitustypen aufspalteten.

In keinem Fall kann bei den F_1-Hybriden ein Zusammenhang zwischen morphologischen Charakteristika und den Inhaltsstoffmustern festgestellt werden (vgl. TETENYI et al. 1963). Dies hätte man z.B. aufgrund der unterschiedlichen Blätter zwischen der proazulenfreien {19} und der proazulenhaltigen {47} erwarten können. Eine genauere Beurteilung dieser Zusammenhänge wird an einer größeren Stichprobe erfolgen müssen.

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden tetraploide Individuen aus vier verschiedenen Sippen der *Achillea millefolium*-Gruppe (*A. ceretanica* SENNEN [tetraploider Cytotyp] (ined.), *A. collina* BECKER, *A. pratensis* SAUKEL & LÄNGER, *A. distans* WALDST. & KIT. subsp. *styriaca* SAUKEL & LÄNGER (ined.)) (*Asteraceae*) diallel miteinander gekreuzt. Inhaltsstoffmuster und morphologische Merkmale der aus Samen gezogenen F_1-Hybriden wurden untersucht.

Die Bestimmung von 5 Sesquiterpenlactonen, 2 Longipinenonderivaten und 2 unbekannten Verbindungen anhand von CH_2Cl_2-Extrakten getrockneter Blütenköpfchen erfolgte mittels qualitativer Dünnschichtchromatographie und erbrachte folgende Ergebnisse:

- Klar unterscheidbare Inhaltsstoffmuster sowohl der Eltern- als auch der F_1-Individuen wurden zu verschiedenen Inhaltsstofftypen zusammengefaßt.
- Die Aufspaltung in verschiedene Sesquiterpentypen in den F_1-Populationen bestätigt die Heterozygotie der Parentalpflanzen.

- Mit der gewählten analytischen Methode konnte keine Rekombination zwischen proazulenfreien und proazulenhaltigen Stoffmustern festgestellt werden.
- Alle Individuen aus einer Kreuzung zweier proazulenhaltiger Elternpflanzen waren proazulenführend.
- F_1-Populationen proazulenfreier Eltern zeigten zwischen 8-16% proazulenhaltige Pflanzen.
- Das Merkmal „proazulenhaltig" dürfte rezessiv vererbt werden.
- Longipinenone konnten sowohl bei proazulenfreien als auch bei proazulenhaltigen Individuen nachgewiesen werden.

Erste morphometrische Analysen einer kleinen Stichprobe zeigten, daß zwischen den beiden F_1-Populationen aus reziproken Kreuzungen keine Unterschiede bestehen.

Der Großteil der F_1-Populationen bot auf der Versuchsfläche ein in sich homogenes Bild, einzelne Nachkommenschaften erwiesen sich jedoch als sehr heterogen.

Literatur

ADLER W., OSWALD K. & R. FISCHER [Hrsg.] (1994): Exkursionsflora von Österreich: Bestimmungsbuch für alle in Österreich wildwachsenden sowie die wichtigsten kultivierten Gefäßpflanzen (Farnpflanzen und Samenpflanzen) mit Angaben über ihre Ökologie und Verbreitung. — Stuttgart-Wien: Ulmer.

AKHILA A. & M. C. NIGAM (1983): Biosynthesis of monoterpenes. — Indian Perf. **27**: 174-196.

AKHILA A., THAKUR R. & S. POPLI (1987): Biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*. — Phytochemistry **26**: 1927-1930.

AKHILA A., RANI K. & R. THAKUR (1990): Biosynthesis of artemisinic acid in *Artemisia annua*. — Phytochemistry **29**: 2129-2132.

AMMON H. P. T. & R. KNAUL (1992): Pharmakologie der Kamille und ihrer Inhaltsstoffe. — Deutsche Apoth. Ztg. **41**: 3-26.

BANTHORPE D. V. & A. BRANCH S. (1985): The biosynthesis of C_5-C_{20} terpenoid compounds. — Nat. Prod. Rep. **2**: 513-524.

BELANGER A. & L. DEXTRAZE (1992): Chemical composition of different plants of *Achillea millefolium*. — Poster, 12th International Congress of Flavours Fragrances and Essential Oils, 4.10.-8.10.1992, Vienna.

BISTE C. (1978): Zytotaxonomische Untersuchungen des Formenkreises *Achillea millefolium* (*Asteraceae*) in der DDR. — Feddes Repert. **88**: 533-613.

BOHLMANN F. & H. JASTROW (1962): Polyacetylenverbindungen, XL - Die Polyine der Gattung *Achillea*. — Chem. Ber. **95**: 1742-1747.

BOHLMANN F. & C. ZDERO (1973): Polyacetylenverbindungen, 215. Neue Inhaltsstoffe aus *Achillea*-Arten. — Chem. Ber. **106**: 1328-1336.

BOHLMANN F., BURKHARDT T. & C. ZDERO (1973): Naturally Occurring Acetylenes. — London: Academic Press.

BREUER J. (1992): Peroxide und andere neue Inhaltsstoffe aus *Achillea*-Arten. — Dissertation, Friedrich Wilhelm Universität, Bonn.

BRUNO M. & W. HERZ (1988): Guaianolides and other constituents of *Achillea ligustica*. — Phytochemistry **27**: 1871-1872.

BUSCHMANN H. & O. SPRING (1993): Impact of interspecific hybridization on sesquiterpene lactone patterns of *Helianthus* species. — Planta Med. **59**: A 579.

CARRON T. R., ROBBINS M. P. & P. MORRIS (1994): Genetic modification of condensed tannin biosynthesis in *Lotus corniculatus*. 1. Heterologous antisense dihydroflavonol reductase downregulates tannin accumulation in „hairy root" cultures. — Theor. Appl. Gen. **87**: 1006-1015.

CAUDERON Y. (1986): Cytogenetics in Breeding Programmes Dealing with Polyploidy Interspecific Hybridization and Introgression. — In: Genetic Manipulation in Plant Breeding (HORN W., JENSEN C. J., ODENBACH W. & O. SCHIEDER [Hrsg.]), pp. 83-104. — Berlin: Walter de Gruyter.

CEKAN Z., HEROUT V. & F. SORM (1956): Structure of Matricin. — Chem. Ind. **21**: 1234-1235.

CEKAN Z., HEROUT V. & F. SORM (1957): Über Terpene LXXX. Die Struktur von Matricin, ein Guajanolid aus der Kamille. — Coll. Czechoslov. Chem. Commun. **22**: 1921.

CERNAJ P., ORAVEC V., BOMBOVA M., TIMKOVA V. & R. HONCARIV (1988a): The effect of mineral nutrition on stem number and drug yield in *Achillea collina* BECKER. — Zahradnictvi **15**: 131-135.

CERNAJ P., ORAVEC M., BOMBOVA V., TIMKOVA V. & R. HONCARIV (1988b): The influence of mineral nutrition on volatile oil content in *Achillea millefolium*, *Compositae*. — Zahradnictvi **15**: 137-140.

CERNAJ P., GALAMBOSI B., HELEMIKOVA A., MARTONFI P. & Z. SZEBENI-GALAMBOSI (1991): Effect of spacing and cultivation site on some biological and agricultural properties of *Achillea collina* BECKER. — Herba Hung. **30**: 15-26.

CHANDLER R.F., HOOPER S.N. & J. M. HARVEY (1982): Ethnobotany and phytochemistry of yarrow,*Achillea millefolium, ompositae*. — Econ. Bot. **36**: 203-223.

CONNOLLY J.D. & R.A. HILL (1994): Dictionary of Terpenoids. — London-New York-Tokyo-Melbourne-Madras: Chapman & Hall.

CROTEAU R. (1991): Metabolism of monoterpenes in Mint (*Mentha*) species. — Planta Med. **57**: 10-14.

CROTEAU R. & J. GERSHENZON (1994): Genetic control of monoterpene biosynthesis in mints (*Mentha*: *Lamiaceae*). In: Genetic engineering of plant secondary metabolism (ELLIS B. E., KUROKI G. W. & H. A. STAFFORD [Hrsg.], Recent advances in phytochemistry vol. 28), p. 193-229. — London-New York: Plenum Press.

CROTEAU R., SATTERWHITE D., CANES D. & C. CHANG (1986): Biosynthesis of monoterpenes. Enantioselectivity in the enzymatic cyclization of (+)- and (-)-linalyl pyrophosphate to (+)- and (-)-bornyl pyrophosphate. — J. Biol. Chem. **261**: 13438-13445.

CUONG B.-N., GACS-BAITZ E., RADICS L., TAMAS J., UJSZASZI K. & G. VERZAR-PETRI (1979): Achillicin, the first proazulene from *Achillea millefolium*. — Phytochemistry **18**: 331-332.

DĄBROWSKA J. (1977): Cytological observations of sixteen taxons of *Achillea millefolium*. — Herb. Polon. **23**: 225-233.

DAVIES M. G. & P. J. KERSEY (1986): Contact allergy to yarrow and dandelion. — Cont. Derm. **14**: 256-257.

DEUFEL J. (1954): Der Azulengehalt tetraploider Schafgarben. — Pharmazie **9**: 756-758.

DEUTSCHMANN F., HOHNMANN B., SPRECHER E. & E. STAHL (1984): Pharmazeutische Biologie - Drogenanalyse I: Morphologie und Anatomie (2/Ed.). — Stuttgart-New York: Gustav Fischer.

EGLSEER K. (1990): Grundlegende Untersuchungen für die Züchtung pharmazeutisch wertvoller Schafgarben unter besonderer Berücksichtigung der Proazulene und Sesquiterpenlactone. — Dissertation, Universität Wien.

EGLSEER K., JURENITSCH J., KORHAMMER S., HASLINGER E., KUBELKA W. & C. M. FRANZ (1990): Structures of the main α-methylene-γ-lactones from *Achillea setacea*. — Planta Med. **56**: 531.

EHRENDORFER F. (1953): Systematische und cytogenetische Untersuchungen an europäischen Rassen des *Achillea millefolium*-Komplexes. — Österr. Bot. Z. **100**: 583-592.

EHRENDORFER F. (1957): Akzessorische Chromosomen, Kreuzungsfertilität und Polyploidie beim *Achillea millefolium*-Komplex (*Compositae*). — Naturwissenschaften **44**: 405-406.

EHRENDORFER F. (1959): *Achillea roseo-alba* EHRENDF., spec. nov., eine hybridogene di- und tetraploide Sippe des *Achillea millefolium*-Komplexes. — Österr. Bot. Z. **100**: 363-368.

EHRENDORFER F. (1963): Probleme Methoden und Ergebnisse der experimentellen Systematik. — Planta Med. **11**: 234-251.

EHRENDORFER F. (1973): New chromosome numbers and remarks on the *Achillea millefolium* polyploid complex in North America. — Österr. Bot. Z. **122**: 133-143.

FIGUEIREDO A. C., BARROSO J. G., PAIS M. S. S. & J. J. C. SCHEFFER (1992a): Composition of the essential oils from two populations of *Achillea millefolium* L. subsp. *millefolium*. — J. Chromatogr. Sci. **30**: 392-395.

FIGUEIREDO A. C., BARROSO J. G., PAIS M. S. S. & J. J. C. SCHEFFER (1992b): Influence of environmental conditions and organ development on the essential oil composition from the flowerheads of two populations of *Achillea millefolium* L. *ssp. millefolium*. — In: 23rd International Symposium on Essential Oils, pp. II-P5.

FISCHER N. H. (1993): „Sesquiterpene Lactones: Biogenesis and Biomimetic Transformations." — Vortrag, GA-Tagung, 31.8.-3.9.1993, Düsseldorf.

FOLLRICH B. (1995): Isolierung von Sesquiterpenen aus *Achillea millefolium* - Typ „DIS A". — Diplomarbeit, Universität Wien.

FOLLRICH B. GAVANELLI A., GLASL S., KASTNER U., SCHUBERT-ZSILAVECZ M., JURENITSCH J. & W. KUBELKA (1995): Longipinene-derivatives from a tetraploid population belonging to the *Achillea millefolium*-group. — Poster, 43rd Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research („Secondary Products - Physiologically Active Compounds"), Halle/Saale, Germany.

FRANZ C. M. (1986): Wege, Ziele und neuere Ergebnisse der Arzneipflanzenzüchtung. — Z. Phytotherapie 7: 48-54.

FRANZ C. (1993): Genetics. *In:* Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production (HAY R. K. M. & P. G. WATERMAN (Hrsg).), pp. 63-96. — Essex: Longman.

FRANZ C. M. & J. WICKEL (1985): Zur Vererbung der Bestandteile des Kamillenöls 1. Mitt.: Qualitative Vererbung von Chamazulen und (-)-α-Bisabolol. — Herba Hung. **24**: 49-59.

GAVANELLI A. (1995): Isolierung und Strukturaufklärung eines weiteren Longipinenons aus *Achillea millefolium* Typ „DIS A" sowie chromatographische Erfassung der intraspezifischen Inhaltsstoffvariation von *Achillea setacea*. — Diplomarbeit, Universität Wien.

GLASL S. (1995): mündliche Mitteilung.

GLASL S., KASTNER U., BAUMANN A., JURENITSCH J. & W. KUBELKA (1993): Three Eudesmanolides from *Achillea pratensis*. — Planta Med. **59**: A 596.

GLASL S., TROPERZER G., KASTNER U., JURENITSCH J., BAUMANN A. & W. KUBELKA (1994): 8-Desacetylmatricarin aus *Achillea collina* BECKER. — Sci. Pharm. **62**: 112.

GLASL S., KASTNER U., BAUMANN A., ROBIEN W., JURENITSCH J. & W. KUBELKA (1995): Eudesmanolides from *Achillea pratensis*. — Phytochemistry **38**: 159-161.

GRAHLE A. (1952): Beobachtungen über die Verbreitung azulenhaltiger Schafgarbenpflanzen. — Z. Naturforsch. **7b**: 326-327.

GREGER H. (1984): Alkamides: structural relationships, distribution and biological activity. — Planta Med. **50**: 366-375.

GREGER H., GRENZ M. & F. BOHLMANN (1981): Amides from *Achillea* species and *Leucocyclus formosus*. — Phytochemistry **20**: 2579-2581.

GREGER H., GRENZ M. & F. BOHLMANN (1982a): Piperidides and other amides from *Achillea* species. — Phytochemistry **21**: 1071-1074.

GREGER H., HOFER O. & A. NIKIFOROV (1982b): New sesquiterpene coumarin ethers from *Achillea* and *Artemisia* species. — J. Nat. Prod. **45**: 455-461.

GREGER H., HOFER O. & W. ROBIEN (1983a): New sesquiterpene coumarin ethers from *Achillea ochroleuca*. 13C-NMR of isofraxidin-derived open-chain and bicyclic sesquiterpene ethers. — J. Nat. Prod. **46**: 510-516.

GREGER H., HOFER O. & W. ROBIEN (1983b): Types of sesquiterpene coumarin ethers from *Achillea ochroleuca* and *Artemisia tripartita*. — Phytochemistry **22**: 1997-2003.

GREGER H., ZDERO C. & F. BOHLMANN (1984): Pyrrolidine and piperidine amides from *Achillea*. — Phytochemistry **23**: 1503-1505.

GUPTA S. (1994): Genetic analysis of some Chemotypes in *Ocimum basilicum var. glabratum*. — Plant Breed. **112**: 135-140.

HALL I. H., LEE K. H., STARNES C. O., SUMIDA Y., WU R. Y., WADDELL T. G., COCHRAN J. W. & K. G. GERHART (1979): Anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds. — J. Pharm. Sci. **68**: 537-542.

HALL I. H., LEE K. H. & H.C. SYKES (1987): Anti-inflammatory agents, IV. Structure activity relationships of sesquiterpene lactone esters derived from helenalin. — Planta Med. **53**: 153-156.

HÄNSEL R., KELLER K., RIMPLER H. & G. SCHNEIDER [Hrsg.] (1992): Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Vol. 4. — Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo-Hong Kong-Barcelona-Budapest: Springer.

HAUSEN B. & G. OESTMANN (1988): Study on the incidence of occupationally induced allergic skin diseases in flower market vendors. — Derm. Beruf u. Umwelt **36**: 117-124.

HAUSEN B. M., BREUER J., WEGLEWSKI J. & G. RÜCKER (1991): α- Peroxyachifolid and other new sensitizing sesquiterpene lactones from yarrow (*Achillea millefolium* L., *Compositae*). — Cont. Derm. **24**: 274-80.

HEGNAUER R. (1989): Chemotaxonomie der Pflanzen VIII. — Basel-Boston-Berlin: Birkhäuser.

HEROLD W. & H. J. HANNING (1979): Modifizierter Nachweis von Proazulen bei *Achillea* spec. als halbquantitative Bestimmung zur Vorselektion im Züchtungsverfahren. — Pharmazie **34**: 41-42.

HIESEY W. M. & M. A. NOBS (1970): Genetic and transplant studies on contrasting species and ecological races of the *Achillea millefolium* complex. — Bot. Gaz. **131**: 245-259.

HOFMANN L. (1993): Einfluß von Genotyp Ontogenese und äußeren Faktoren auf pflanzenbauliche Merkmale sowie ätherische Öle und Flavonoide von Klonen der Schafgarbe (*Achillea millefolium*-Aggregat). — Dissertation, Technische Universität München.

HOFMANN L. & D. FRITZ (1991): Eignung verschiedener Schafgarbenherkünfte für den heimischen Anbau. — Drogenreport (Sonderausgabe zur Fachtagung „Arzneipflanzen '91" vom 9.10. bis 11.10.1991 in Erfurt): pp. 31-38.

HORN W., FRANZ C. & I. WICKEL (1988): Genetics of bisaboloids in chamomile. — Plant Breed. **101**: 307-312.

JEZEK B. (1989): Kreuzungsversuche an europäischen Vertretern des *Achillea millefolium*-Komplexes. — Diplomarbeit, Universität für Bodenkultur, Wien.

KASTNER U. (1991): Über Proazulene und verwandte Sesquiterpenlaktone in verschiedenen Taxa der *Achillea millefolium*-Gruppe. — Dissertation, Universität Wien.

KASTNER U., REZNICEK G., JURENITSCH J., KUBELKA W., BAUMANN A., ROBIEN W., SOSA S. & R. DELLA LOGGIA (1990): A new proazulene from *Achillea aspleniifolia*. — Planta Med. **56**: 531.

KASTNER U., JURENITSCH J., GLASL S., BAUMANN A., ROBIEN W. & W. KUBELKA (1991a): The major proazulenes of *Achillea roseo-alba* EHREND. — Pharm. Pharmacol. Lett. **1**: 53-54.

KASTNER U., JURENITSCH J., BAUMANN A., ROBIEN W. & W. KUBELKA (1991b): Three unusual 3-oxa-guaianolides from *Achillea roseo-alba* EHREND. and *Achillea collina* BECKER. — Pharm. Pharmacol. Lett. **1**: 55-56.

KASTNER U., JURENITSCH J., GLASL S., LEHNER S., BAUMANN A., ROBIEN W. & W. KUBELKA (1991c): New proazulenes of different taxa belonging to the *Achillea millefolium* group. — Planta Med. **57**: A 82.

KASTNER U., JURENITSCH J., LEHNER S., BAUMANN A., ROBIEN W. & W. KUBELKA (1991d): The major proazulenes from *Achillea collina* BECKER - A revision of structure. — Pharm. Pharmacol. Lett. **1**: 27-28.

KASTNER U., GLASL S., JURENITSCH J., BAUMANN A., ROBIEN W. & W. KUBELKA (1992a): 3-Oxa-guaianolides from the cultivar *Achillea collina* PROA. — Sci. Pharm. **60**: 163.

KASTNER U., SAUKEL J., ZITTERL-EGLSEER K., LÄNGER R., REZNICEK G., JURENITSCH J. & W. KUBELKA (1992b): Ätherisches Öl – ein zusätzliches Merkmal für die Charakterisierung der mitteleuropäischen Taxa der *Achillea millefolium*-Gruppe. — Sci. Pharm. **60**: 87-99.

KASTNER U., MOSSBECK A., SAUKEL J. & J. JURENITSCH (1993a): Charakterisierung von Schafgarben-Drogen des Handels. — Sci. Pharm. **61**: 206-208.

KASTNER U., SOSA S., WOLF M., TUBARO A., JURENITSCH J. & R. DELLA LOGGIA (1993b): Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von Tees aus verschiedenen Taxa der *Achillea millefolium*-Gruppe. — Sci. Pharm. **61**: 47-54.

KASTNER U., GLASL S. & J. JURENITSCH (1995): *Achillea millefolium* - ein Gallentherapeutikum? — Z. Phytotherapie **16**: 34-36.

KASYMOV S. Z. & G. P. SIDYAKIN (1972): Lactones of *Achillea millefolium*. — Khim. Prir. Soedin. **2**: 246-247.

KENNEDY A. I., DEANS S. G., SVOBODA K. P., GRAY A. I. & P. G. WATERMAN (1993): Volatile oils from normal and transformed root of *Artemisia absinthium*. — Phytochemistry **32**: 1449-1451.

KLAYMAN D. (1985): Quinghaosu (Artemisinin): An antimalarial drug from China. — Science **228**: 1049-1055.

KOEZUKA Y., HONDA G. & M. TABATA (1986): Genetic control of the chemical composition of volatile oils in *Perilla frutescens*. — Phytochemistry **25**: 859-863.

KOLODZIEJ H. (1993): Sesquiterpenlactone. Biologische Aktivitäten. — Deutsche Apoth. Ztg. **133**: 1795-1805.

KOZLOWSKI J. & J. LUTOMSKI (1969): Über den Gehalt an ätherischem Öl, Azulen und Bitterstoffen in selektierten Klonen der *Achillea millefolium* L. s.l. — Planta Med. **17**: 226-229.

KUPCHAN S. M., FESSLER D. C., EAKIN M. A. & T. J. GIACOBBE (1970): Reactions of α-methylene lactone tumor inhibitors with model biological nucleophiles. — Science **168**: 376-378.

LEE K. H., MATSUEDA S. & T. A. GEISSMAN (1971): Sesquiterpene lactones of *Artemisia*: New guaianolides from fall growth of *A. douglasiana*. — Phytochemistry **10**: 405-410.

LINDE H. H. A. & M. S. RAGAB (1967): Über Inhaltsstoffe von *Achillea santolina* L. (*Compositae*). — Helv. Chim. Acta **50**: 1961.

LOIDL J., EHRENDORFER F. & D. SCHWEIZER (1990): EM analysis of meiotic chromosome pairing in a pentaploid *Achillea* hybrid. — Heredity **65**: 11-20.

MATHE I., SVAB J., TETENYI P. & E. TYIHAK (1963): Untersuchungen über die Azulenverbindungen der *Achillea*-Arten - 3. Mitteilung: *Achillea millefolium* L. und ihr Formenkreis in Ungarn. — Pharmazie **18**: 568-572.

MCCASKILL D. & R. CROTEAU (1994): Recent advances in terpenoid biosynthesis: implications for essential oil production. In: 4èmes recontres t(e) echniques et economiques. — Plantes aromatiques et medicinales (VERLET N. [Hrsg.], Nyons, 5.-7.12.1994, p. 92-102.

MITCHELL J. C., FRITIG B., SINGH B. & G. H. TOWERS (1970): Allergic contact dermatitis from *Frullania* and *Compositae*. The role of sesquiterpene lactones. — J. Invest. Dermatol. **54**: 233-239.

MURRAY M. J., LINCOLN D. E. & F. W. HEFENDEHL (1980): Chemogenetic evidence supporting multiple allele control of the biosynthesis of (—)-menthone and (+)-isomenthone stereoisomers in *Mentha* species. — Phytochemistry **19**: 2103-2110.

NYIREDY S., ERDELMEIER C. A. J., MEIER B. & O. STICHER (1985): „PRISMA": Ein Modell zur Optimierung der mobilen Phase für die Dünnschichtchromatographie vorgestellt anhand verschiedener Naturstofftrennungen. — Planta Med. **51**: 241-246.

OCHIR G., BUDESINSKY M. & O. MOTL (1991a): 3-Oxa-guaianolides from *Achillea millefolium*. — Phytochemistry **30**: 4163-4165.

OCHIR G., BUDESINSKY M. & O. MOTL (1991b): New sesquiterpene lactones from the *Achillea* genus. — Planta Med. **57**: A 86.

OSWIECIMSKA M. (1974): Korrelation zwischen Chromosomenzahl und Prochamazulenen in *Achillea* von Osteuropa. — Planta Med. **25**: 289-295.

PANK F. (1991): Briefliche Mitteilung. Zentralinstitut für Sonderkulturen und Zierpflanzen beim Ministerium für Ernährung, Land- und Forstwirtschaft, Bernburg, DDR.

PETZOLDT S. (1991): *Hemimene petiverella* L., ein ursächlicher Schädling der Vergreisung bei Schafgarbe (*Achillea millefolium* L.). — Drogenreport **4**: 52-54.

PICMAN A. K. (1986): Biological activities of sesquiterpene lactones (Review article number 7). — Biochem. Syst. Ecol. **14**: 255-281.

RAJAONARIVONY J. I. M., GERSHENZON J. & R. CROTEAU (1992): Characterization and mechanism of (4S)-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha* x *piperita*). — Arch. Biochem. Biophys. **296**: 49-57.

REHBERGER U., SAUKEL J. & W. KUBELKA (1994): Untersuchung von Trockenrasensippen der *Achillea millefolium*-Gruppe. — Sci. Pharm. **62**: 120.

RODRIGUEZ E., TOWERS G. H. N. & J. C. MITCHELL (1976): Biological activities of sesquiterpene lactones. — Phytochemistry **15**: 1573-1580.

RÜCKER G., MANNS D. & J. BREUER (1991): Guaianolid-Peroxide aus der Schafgarbe, *Achillea millefolium* L., Auslöser der Schafgarbendermatitis. — Arch. Pharm. **324**: 979-981.

SAFAYHI H., SABIERAJ J., SAILER E. R. & H. P. T. AMMON (1994): Chamazulene: an antioxidant-type inhibitor of leukotriene B4 formation. — Planta Med. **60**: 410-413.

SAUKEL J. & R. LÄNGER (1990): Merkmalsvariation kultivierter Pflanzen des *Achillea millefolium*-Aggregates. — Sci. Pharm. **58**: 321-334.

SAUKEL J. & R. LÄNGER (1992a): *Achillea pratensis* SAUKEL & LÄNGER, spec. nova, eine tetraploide Sippe des *Achillea millefolium*-Komplexes. — Phyton **32**: 159-172.

SAUKEL J. & R. LÄNGER (1992b): Die *Achillea millefolium*-Gruppe (*Asteraceae*) in Mitteleuropa, 1 – Problemstellung, Merkmalserhebung und Untersuchungsmaterial. — Phyton **31**: 185-207.

SAUKEL J. & R. LÄNGER (1992c): Die *Achillea millefolium*-Gruppe (*Asteraceae*) in Mitteleuropa, 2 – Populationsvergleich, multivariate Analyse und biosystematische Anmerkungen. — Phyton **32**: 47-78.

SAUKEL J. & W. KUBELKA (1994): Volksmed.-Datenbank. Volksmedizinisch verwendete Arzneipflanzen in Österreich. — Sci. Pharm. **62**: 100.

SCHRÖDER H., KASTNER U., GARGULA K., BUDESINSKY M., HASLINGER E., JURENITSCH J. & W. KUBELKA (1994): Artabsin and 3-oxa-artabsin derivatives from *Achillea millefolium* species. — Phytochemistry **36**: 1449-1451.

SCHÜTZ H. (1992): Der korrigierte Rf-Wert, Ermittlung und Bedeutung für die toxikologische Analytik. — Pharmazie in unserer Zeit **18**: 161-168.

SMITH C. J. S., WATSON C. F., RAY J., BIRD C. R., MORRIS P. C., SCHUCH W. & D. GRIERSON (1988): Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. — Nature **334**: 724-726.

SMOLENSKI S. J., BELL C. L. & L. BAUER (1967): The isolation of Achillin from *Achillea millefolium*. — Lloydia **30**: 144-149.

STAHL E. (1952): Ist der Proazulengehalt der Schafgarbe (*Achillea millefolium* L.) genetisch oder umweltbedingt? — Pharmazie **7**: 863-868.

STAHL E. (1954a): Über das Chamazulen und dessen Vorstufe, 2. Mitt.: Chamzulencarbonsäure aus Kamille. — Chem. Ber. **87**: 505-507.

STAHL E. (1954b): Über das Chamazulen und dessen Vorstufe, 3. Mitt.: Zur Konstitution der Chamazulencarbonsäure. — Chem. Ber. **87**: 1626-1628.

STAHL E. (1955): Neuere Untersuchungen zur Kenntnis der Schafgarbe und anderer Proazulendrogen. — Planta Med. **3**: 50-54.

STAHL E. (1967): Dünnschichtchromatographie (2. Aufl.) — Berlin-Heidelberg-New York: Springer.

STEFANOVIC M., DJERMANOVIC V., GORUNOVIC M., DJERMANOVIC M., MACURA S. & S. MILOSAVLJEVIC (1989): Sesquiterpene lactones from *Achillea abrotanoides*. — Phytochemistry **28**: 1765-1767.

TETENYI P. (1961): Über das Problem der infraspezifischen chemischen Taxa von *Matricaria chamomilla* L. — Pharmazie **16**: 273-278.

TETENYI P., TYIHAK E., MATHE I. & J. SVAB (1962): Untersuchungen über die Azulenverbindungen der *Achillea*-Arten — 1. Mitteilung: Mikrochemische Untersuchungsmethoden. — Pharmazie **17**: 463-466.

TETENYI P., TYIHAK E., MATHE I. & J. SVAB (1963): Untersuchungen über die Azulenverbindungen der *Achillea*-Arten — 4. Mitteilung: Komponenten und chemische Taxa von *Achillea millefolium* L. — Pharmazie **19**: 56-60.

TEUSCHER E. & U. LINDEQUIST (1994): Biogene Gifte. — Stuttgart-Jena-New York: Gustav Fischer.

TSANKOVA E. & I. OGNYANOV (1985): Chemical constituents of *Achillea depressa*. — Planta Med. **51**: 180.

TYIHAK E., MATHE I., SVAB J. & P. TETENYI (1963): Untersuchungen über die Azulenverbindungen der *Achillea*-Arten — 2. Mitteilung: *Achillea aspleniifolia* VENT. — Pharmazie **18**: 566-568.

ULUBELEN A., ÖKSÜZ S. & E. TUZLACI (1988): New sesquiterpenoids from *Achillea schischkinii*. — Planta Med. **54**: 473-474.

ULUBELEN A., ÖKSÜZ S. & A. SCHUSTER (1990): A sesquiterpene lactone from *Achillea millefolium ssp. millefolium*. — Phytochemistry **29**: 3948-3949.

VALANT-VETSCHERA K. M. (1984): Leaf flavonoids of the *Achillea millefolium* group I: infraspecific variability in *A. setacea* and related species. — Sci. Pharm. **52**: 307-311.

VALANT-VETSCHERA K. M. (1985a): Flavonoid diversification in *Achillea ptarmica* and allied taxa. — Biochem. Syst. Ecol. **13**: 15-21.

VALANT-VETSCHERA K. M. (1985b): C-Glycosylflavones in roots and aerial parts of some *Achillea* species. — Biochem. Syst. Ecol. **13**: 119-121.

VALANT-VETSCHERA K. M. & E. WOLLENWEBER (1988): Leaf flavonoids of the *Achillea millefolium*-group Part II: distribution patterns of free aglycones in leaf exudates. — Biochem. Syst. Ecol. **16**: 605-614.

VALANT K., BESSON E. & J. CHOPIN (1978): C-Glycosylflavones from the genus *Achillea*. — Phytochemistry **17**: 2136-2137.

VERZAR-PETRI G., TAMAS J., RADICS L. & K. UJSZASZI (1980): Separation and identification of prochamazulenes of *Achillea millefolium* L. *ssp. collina* BECKER. — Herba Hung. **19**: 105-112.

WAGENITZ G. (1979): *Achillea* In: HEGI G., Illustrierte Flora von Mitteleuropa Vol. VI/3: 310-349. — Berlin-Hamburg: Paul Parey.

WELZEL O. (1995): Auswertung von Kreuzungsexperimenten an tetraploiden Schafgarben mittels chemischer Analyse flüchtiger und nicht flüchtiger terpenoider Inhaltsstoffe. — Diplomarbeit, Universität Wien.

WHITE E. H. & R. E. K. WINTER (1963): Natural products from *Achillea lanulosa*. — Tetrahedron Lett. **3**: 137-140.

WILLUHN G. (1987): Sesquiterpenlactone, potentielle Leitsubstanzen für die Arzneistoffindung. — Deutsche Apoth. Ztg. **48**: 2511-2517.

WINK M. (1988): Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. — Theor. Appl. Gen. **75**: 225-233.

WITTENBERG R. & H. CRAMER (1992): Datenanalyse mit SPSS. — Stuttgart-Jena: Gustav Fischer.

WRICKE G. & W. E. WEBER (1986): Quantitative Genetics and Selection in Plant Breeding. — Berlin-New York: Walter de Gruyter.

ZITTERL-EGLSEER K., JURENITSCH J., KORHAMMER S., HASLINGER E., SOSA S., DELLA LOGGIA R., KUBELKA W. & C. M. FRANZ (1991): Entzündungshemmende Sesquiterpenlactone von *Achillea setacea* (Sesquiterpene lactones of *Achillea setacea* with antiphlogistic activity). — Planta Med. **57**: 444-446.

Anschrift des Verfassers: Dr. Stefan VETTER,
Veterinärmedizinische Universität Wien,
Institut für Botanik und Lebensmittelkunde,
Linke Bahngasse 11, A-1030 Wien, Austria.